



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
2015

**Catarina de Fátima  
Marques Eusébio**

**Avaliação do efeito da adição de vários produtos  
enológicos na espuma do vinho espumante.**





**Catarina de Fátima  
Marques Eusébio**

**Avaliação do efeito da adição de vários produtos  
enológicos na espuma do vinho espumante.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia- Ramo, alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Elisabete Verde Martins Coelho, pós-doc do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, co-orientação do Doutor Filipe Miguel Monteiro Centeno da Costa, responsável pela direção de Investigação e Desenvolvimento da Proenol, Indústria Biotecnológica, Lda e co-orientação do Engenheiro Francisco Nuno Peres Jorge Antunes, responsável pela direção do departamento de Enologia da Aliança Vinhos de Portugal, S.A.



À minha mãe.



## **o júri**

presidente

Professor Doutor José António Teixeira Lopes da Silva  
Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

Professora Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo  
Professora associado com agregação do Departamento de Química da  
Universidade de Aveiro

orientador

Doutora Elisabete Verde Martins Coelho  
Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro





## **Agradecimentos**

Agradecimento especial à Dr.<sup>a</sup> Elisabete Coelho pela motivação, disponibilidade, paciência e conhecimento transmitido ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Manuel A. Coimbra por todo o conhecimento transmitido ao longo dos anos.

A todo o pessoal do laboratório, pelo acolhimento, companheirismo e disponibilidade.

Ao Eng.<sup>o</sup> Francisco Antunes e ao Dr. Filipe Centeno, pela oportunidade dada e por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos.

Um agradecimento especial a todas as pessoas da Aliança Vinhos de Portugal S.A., com destaque à Eng.<sup>a</sup> Ana Borralho, Eng.<sup>a</sup> Leonor e Eng.<sup>a</sup> Maria, pela partilha de conhecimentos e experiência. Fica também um agradecimento especial ao Armando e à Jurgita, pela ajuda incansável, amizade e partilha.

À minha colega de estágio, Vânia, pelo companheirismo, alegria, amizade e partilha nesta aventura.

À família Morgado, pela bondade, carinho e acolhimento.

A todos os que me rodeiam e são importantes para mim.



## Palavras-chave

Vinho espumante, espuma, polissacarídeos, manoproteínas, segunda fermentação, produtos enológicos.

## Resumo

A qualidade do vinho espumante está intimamente relacionada com o seu aroma, volume e persistência da espuma. Os vinhos espumantes são obtidos após uma segunda fermentação em garrafa, seguido de um prolongado envelhecimento *sur lies*. Estes vinhos têm que conter no mínimo 3 bar de CO<sub>2</sub> supersaturado. A autólise de leveduras ocorre durante o envelhecimento dos vinhos espumantes, causando a liberação de muitos compostos citoplasmáticos e da parede celular que têm uma grande influência sobre o vinho espumante de qualidade. A autólise é um processo demorado e por esse motivo tem-se vindo a procurar alternativas biotecnológicas para acelerar e melhorar esse processo.

Este trabalho decorreu em ambiente empresarial, conjugando os interesses de uma empresa produtora de vinhos espumantes, a Aliança Vinhos de Portugal S.A., e uma empresa produtora de produtos enológicos, a Proenol Indústria Biotecnológica, Lda. Neste trabalho foram produzidos três vinhos base diferentes, provenientes do mesmo mosto, e nove modalidades de vinhos espumantes. Durante a primeira fermentação, para obtenção do vinho base, foi realizado um vinho base controlo, Affinity (Aff), um vinho base que fermentou com a aplicação do produto enológico Optimum White®, AffOW, e um terceiro, onde foi estudado a influência do uso de duas espécies de leveduras fermentativas diferentes (*Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspora delbrueckii*), AffBd, tendo sido avaliado a quantidade e estabilidade da espuma de cada um deles. Durante a segunda fermentação, cada um dos vinhos base obtidos foram divididos em três modalidades, sem adição de qualquer produto enológico, outro com a adição de Optimum White® e o terceiro com a adição de OptiRED®. Foram avaliadas as propriedades de espuma de todos os vinhos base e espumantes produzidos usando um método baseado no aparelho Mosalux. Foi também avaliada a composição de açúcares livres e polissacarídeos dos vinhos base, vinhos espumantes e dos produtos enológicos utilizados para relacionar a composição destes com as propriedades de espuma. Aos vinhos espumantes obtidos foi realizada uma prova organolética descritiva e de preferência.

No vinho base produzido, o AffBd revelou ter maior quantidade de manoproteínas e apresentava um maior volume de espuma. Os vinhos espumantes obtidos apresentam um intervalo de quantidade de manoproteínas de 1,3-7,5 g. L<sup>-1</sup>. Os vinhos espumantes que apresentam melhores propriedades de espuma, como a altura máxima da espuma (HM) após injeção de CO<sub>2</sub>, altura de estabilidade da espuma (HS) durante a injeção de CO<sub>2</sub> e tempo de estabilidade da espuma (TS) após interrupção de CO<sub>2</sub>, apresentavam concentrações elevadas de manoproteínas na ordem dos 2,7-4,1 g. L<sup>-1</sup>. Apesar de existir uma relação entre a quantidade de manoproteínas e os valores de HM e HS, a partir de valores de concentração superiores a 4,1 g. L<sup>-1</sup> não se verificou um incremento significativo nos valores de HM e HS. No entanto, para o mesmo valor de concentração de manoproteínas, o valor de TS varia de 22 s para 78 s, não sendo a concentração de manoproteínas o único parâmetro diretamente relacionado com o aumento da estabilidade da espuma. A análise sensorial revelou uma preferência para o vinho com adição

de Optimum White® nas duas fermentações e uma preferência generalizada para os vinhos que tiveram em contato com este produto enológico durante a primeira fermentação. A preferência dos provadores incide sobre os vinhos que obtiveram melhores propriedades de espuma, nomeadamente na quantidade e estabilidade da mesma.

## Keywords

Sparkling wine, foam, polysaccharides, mannoproteins, second fermentation, oenological products

## Abstract

The quality of the sparkling wine is closely related to its aroma, volume and persistence of foam. Sparkling wines are obtained after a second fermentation in the bottle, followed by a prolonged aging *sur lies*. These wines must contain at least 3 bar of supersaturated CO<sub>2</sub>. The autolysis of yeast occurs during aging sparkling wines, enhancing the release of cytoplasmatic and cell wall compounds that have influence on the quality of sparkling wine. The autolysis is a slow process, therefore has been efforts for biotechnological alternatives in order to accelerate and enhance this process.

This work was carried on industry, combining the interests of a winery company, the Aliança Vinhos de Portugal S.A. and a producer of oenological products, Proenol Indústria Biotecnológica, Lda. In this work three different base wines were produced from the same must, and nine different sparkling wines. Upon the first fermentation were produced three base wines, a control base wine, Affinity (Aff), a base wine fermented with the application of oenological product Optimum White®, AffOW and a third base wine, fermented with two different yeasts species (*Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*), AffBd, the foamability and foam stability were evaluated in the three base wines. In order to perform the second fermentation, each base wine were divided into three different lots, one lot was the control wine, without adding any oenological product, one lot with the addition of Optimum White®, and the third lot with the addition of OptiRED®. The foam properties were evaluated for all base and sparkling wines produced using the methodology based on Mosalux device. In order to relate the sugar composition with foam properties it was also evaluated the composition of free sugars and polysaccharides of the base wines, sparkling wines and oenological products. Sparkling wines obtained were also evaluated by a descriptive organoleptic and preference test. Concerning the base wine produced, the AffBd showed higher amount of mannoproteins and exhibited the highest volume of foam. The sparkling wines showed an amount of mannoproteins ranging from 1.3 to 7.5 g. L<sup>-1</sup>. The sparkling wines that have better foam properties such as the maximum height of foam (HM) after injection of CO<sub>2</sub>, height of the foam on stability (HS) during the injection of CO<sub>2</sub> and foam stability time (TS) after cessation of CO<sub>2</sub> presented high concentrations of mannoproteins in the range of 2.7 to 4.1 g. L<sup>-1</sup>. Although there was a relationship between the amount of mannoproteins and HM and HS values, for concentrations higher than 4.1 g. L<sup>-1</sup> no significant increase was observed. However, for the same value of mannoprotein concentration, the range of TS was from 22 s to 78 s, and the concentration of mannoproteins are not the only parameter related to the increase in foam stability. Sensory analysis showed a preference for wine with the addition of Optimum White® in the two fermentations and a general preference for wines that had contact with this oenological product during the first fermentation. The consumer preferred the wines with better foam properties, namely in the amount and stability of the foam.



# Índice

Índice de Figuras .....	v
Índice de Tabelas .....	vii
Lista de abreviaturas .....	ix
1 - Revisão Bibliográfica .....	1
1.1 - O vinho espumante .....	3
1.2 - Produção de vinho espumante .....	4
1.2.1 - Produção do vinho base: vinificação de brancos .....	5
1.2.2 - Segunda fermentação .....	7
1.3 - Características da espuma dos vinhos espumantes .....	10
1.3.1 - Bolhas .....	15
1.3.2 - Efervescência .....	16
1.3.3 - Papel das proteínas e polissacarídeos na espumabilidade .....	17
1.3.4 - Compostos fenólicos e cor .....	22
1.3.5 - Aroma e compostos voláteis .....	22
1.4 - Biotecnologia aplicada à produção de vinhos espumantes .....	24
1.4.1 - Seleção de linhagens de levedura .....	24
1.4.1.1 - Linhagens com capacidade floculativa .....	25
1.4.1.2 - Linhagens com capacidade autolítica .....	26
1.4.1.3 - Linhagens sobrexpressoras de manoproteínas .....	27
1.4.2 - Preparados secos de leveduras inativas .....	28
1.4.3 - Leveduras imobilizadas .....	35
1.4.4 - Preparados enzimáticos .....	36
1.4.4.1 - Pectinases .....	37
1.4.4.2 - Glucanases .....	39

2 - Contextualização do trabalho.....	41
2.1 - Aliança Vinhos de Portugal S.A. ....	43
2.2 - Proenol - Indústria Biotecnológica, Lda .....	43
2.3 - Vinhos espumantes.....	44
2.4 - Objetivos do trabalho .....	45
3 - Metodologias.....	47
3.1 - Vinificação .....	49
3.2 - Análises físico-químicas .....	52
3.2.1 - Determinação da massa volúmica a 20 °C ( $\rho_{20}$ ) de mostos .....	52
3.2.2 - Determinação da sobrepressão .....	53
3.4 - Isolamento do material polimérico.....	54
3.4.1 - Fracionamento por ultrafiltração .....	54
3.4.2 - Fracionamento por diálise .....	55
3.5 - Análise de açúcares .....	55
3.6 - Determinação de ácidos urónicos.....	57
3.7 - Medição das propriedades da espuma.....	58
3.8 - Análise sensorial .....	58
3.9 - Análise Estatística .....	59
4 - Resultados e Discussão .....	61
4.1 - Monitorização da massa volúmica e cinética fermentativa – 1ª fermentação.....	63
4.2 - Monitorização da sobrepressão e cinética fermentativa – 2ª fermentação.....	64
4.3 - Isolamento e caracterização do material polimérico e de baixo peso molecular ....	67
4.3.1 - Polissacarídeos dos produtos enológicos.....	67
4.3.2 - Açúcares livres dos vinhos bases.....	69
4.3.3 - Polissacarídeos dos vinhos bases.....	71
4.3.4 - Polissacarídeos dos vinhos espumantes.....	72



4.4 - Avaliação das propriedades de espuma dos vinhos.....	75
4.4.1 - Propriedades de espuma do vinho base .....	75
4.4.2 - Propriedades da espuma do vinho base após os processos de filtração tangencial e eletrodialise .....	77
4.4.3 - Propriedades da espuma do vinho base após tiragem e filtração.....	78
4.4.4 - Propriedades da espuma do vinho espumante .....	81
4.5 - Relação entre as propriedades da espuma e a concentração de manoproteínas dos vinhos espumantes .....	83
4.6 - Análise sensorial.....	87
4.6.1 - Quantidade de espuma .....	87
4.6.2 - Estabilidade da espuma.....	88
4.6.3 - Efervescência das bolhas .....	89
4.6.4 - Cor dos vinhos espumantes.....	90
4.6.5 - Aroma dos vinhos espumantes .....	90
4.6.6 - Gosto dos vinhos espumantes .....	91
4.6.7 - Apreciação global dos vinhos espumantes .....	93
5 - Conclusão .....	95
6 - Bibliografia .....	99
7 - Anexos.....	111



## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Esquema de elaboração de vinho espumante pelo método tradicional.....	10
<b>Figura 2</b> - Fotografia de <i>flute</i> típica de vinho espumante (A) e um <i>close-up</i> dos locais de nucleação da bolha (B) .....	11
<b>Figura 3</b> - Esquema das bolhas e formação da espuma .....	12
<b>Figura 4</b> - Esboço da bolha e a representação interface .....	13
<b>Figura 5</b> - Estrutura hipotética de RG-II .....	19
<b>Figura 6</b> - Manoproteínas de <i>S.cerevisiae</i> com ligação a proteína tipo N e O .....	21
<b>Figura 7</b> - Origem dos diferentes compostos liberados por leveduras durante a autólise ..	29
<b>Figura 8</b> - Substrato de pectina e a ação da pectidase sobre este. ....	38
<b>Figura 9</b> - Esquema geral do processo de vinificação realizado. ....	52
<b>Figura 10</b> - Conversão da $\rho T$ em $\rho 20$ . Sendo $\rho 20$ a massa volúmica a 20°C; $\rho T$ a massa volúmica obtida na análise à temperatura ambiente e C o factor conversor .....	53
<b>Figura 11</b> - Conversão da PT em P20, a 20 °C, sendo PT a sobrepressão à temperatura T e C o factor conversor .....	54
<b>Figura 12</b> - Evolução temporal da massa volúmica corrigida a 20 °C ( $\rho 20$ ).....	63
<b>Figura 13</b> - Evolução temporal da segunda fermentação em função da pressão de CO <sub>2</sub> ..	66
<b>Figura 14</b> - Valores de HM, HS e TS dos vinhos base.....	76
<b>Figura 15</b> - Valores de HM, HS e TS dos vinhos base após filtração tangencial.....	78
<b>Figura 16</b> - Valores de HM, HS e TS dos vinhos base após eletrodialise.....	78
<b>Figura 17</b> - Valores de HM, HS e TS dos vinhos após adição do licor de tiragem e produtos enológicos.....	80
<b>Figura 18</b> - Valores de HM, HS e TS dos nove vinhos após filtração posterior à adição do licor de tiragem e produtos enológicos.....	81
<b>Figura 19</b> - Valores de HM, HS e TS dos nove vinhos espumantes obtidos.....	82

<b>Figura 20</b> - Relação entre a concentração de manoproteínas nos vinhos e a sua espumabilidade HM e HS (cm). .....	86
<b>Figura 21</b> - Relação entre a concentração de manoproteínas nos vinhos e a sua estabilidade TS (s). .....	86
<b>Figura 22</b> - Distribuição das respostas dos provadores sobre a quantidade de espuma. ....	87
<b>Figura 23</b> - Distribuição das respostas do painel sobre o parâmetro estabilidade dos nove vinhos espumantes.....	88
<b>Figura 24</b> - Distribuição das respostas do painel sobre o parâmetro efervescência dos nove vinhos espumante. ....	89
<b>Figura 25</b> - Avaliação da cor dos vinhos espumantes .....	90
<b>Figura 26</b> - Avaliação do aroma do vinho espumante.....	91
<b>Figura 27</b> - Avaliação do gosto do vinho espumante. ....	92
<b>Figura 28</b> - Avaliação da apreciação global do vinho espumante.....	93

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Frações, rendimentos, percentagem de concentração e concentração de hidratos de carbono (HC) extraídos dos produtos enológicos utilizados com e sem diálise.....	69
<b>Tabela 2</b> - Rendimentos, percentagem molar dos açúcares e concentração de açúcares livres totais no vinho base. ....	69
<b>Tabela 3</b> - Frações, rendimentos, percentagem de concentração e concentração de hidratos de carbono (HC) extraídos das fracções de alto peso molecular obtidas por UF do vinho base (após primeira fermentação).....	72
<b>Tabela 4</b> - Frações, rendimentos, percentagem de concentração e concentração de hidratos de carbono (HC) das fracções de alto peso obtidos por diálise do vinho final das nove variáveis (após segunda fermentação em garrafa).....	74



## Lista de abreviaturas

**AA:** acetato de alditol

**Aff:** vinho base obtido pelo método tradicional, usando a levedura *S. cerevisiae* comercial Affinity® ECA5

**Aff\_C:** vinho espumante obtido da primeira (Aff) e segundas fermentações com a levedura comercial de controlo Affinity® ECA5

**Aff\_OW:** vinho espumante obtido da primeira fermentação com a levedura comercial de controlo Affinity® ECA5 (Aff) e na segunda com utilização do produto enológico Optimum White®

**Aff\_R:** vinho espumante obtido da primeira fermentação com a levedura comercial de controlo Affinity® ECA5 (Aff) e na segunda com utilização do produto enológico OptiRED®

**AffBd:** vinho base obtido pela fermentação realizada com duas leveduras, a *S. cerevisiae* comercial Affinity® ECA5 e a *T. delbrueckii* comercial Biodiva™ TD291

**AffBd\_C:** vinho espumante obtido da primeira fermentação AffBd e na segunda com a levedura comercial de controlo Affinity® ECA5

**AffBd\_OW:** vinho espumante obtido da primeira fermentação AffBd e na segunda com utilização do produto enológico Optimum White®

**AffBd\_R:** vinho espumante obtido da primeira fermentação AffBd e na segunda com utilização do produto enológico OptiRED®

**AffOW:** vinho base obtido pelo com a levedura comercial de controlo, usando a levedura *S. cerevisiae* comercial Affinity® ECA5 e o produto enológico Optimum White®

**AffOW\_C:** vinho espumante obtido da primeira fermentação AffOW e na segunda pelo com a levedura comercial de controlo Affinity® ECA5

**AffOW\_OW:** vinho espumante obtido da primeira fermentação AffOW e na segunda com utilização do produto enológico Optimum White®

**AffOW\_R:** vinho espumante obtido da primeira fermentação AffOW e na segunda com utilização do produto enológico Optimum Red®

**AGP:** arabinogalactanas ligadas a proteínas

**Ara:** arabinose

**AU:** ácidos urónicos

**CE:** Comissão Europeia

**CEE:** Comunidade Económica Europeia

**DAP:** Diidrogenofosfato de amónio

**dRib:** desoxirribose

**Fuc:** fucose

**GC-FID:** cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama

**Glc:** glucose

**HC:** hidratos de carbono

**HM:** altura máxima da espuma

**HMW:** alto peso molecular

**LMW:** baixo peso molecular

**HS:** altura de estabilidade da espuma

**Man:** manose

**MFF:** *m*-fenilfenol

**MW:** peso molecular

**OIV:** The International Organisation of Vine and Wine

**PUFA:** ácidos gordos polinsaturados

**PVPP:** polivinilpolipirrolidona

**RG-II:** ramnogalacturonanas do tipo II

**Rha:** ramnose

**Rib:** ribose

**rpm:** rotações por minuto

**TS:** tempo de estabilidade da espuma

**UF:** ultrafiltração

**Xyl:** xilose

**η:** rendimento

**% mol:** percentagem molar





# **1 - Revisão Bibliográfica**



## 1 – Revisão Bibliográfica

### 1.1 - O vinho espumante

O vinho espumante é um tipo de vinho que contém dióxido de carbono supersaturado dissolvido e a sua característica mais proeminente é a formação de bolhas e espuma quando colocado num copo alto, denominado de *flute*. Este dióxido de carbono tem que ser exclusivamente endógeno, ou seja, derivado apenas da fermentação [1].

Os espumantes são classificados de acordo com o método de produção, dentro destes destacam-se três: tradicional (Champanhês), contínuo e o *Charmat*. O método tradicional consiste basicamente numa dupla fermentação do mosto, a primeira em cubas e a segunda em garrafas, fazendo a *remuage* (rotação das garrafas) regularmente. No método contínuo, o vinho circula dentro de uma série de tanques, com aparas de carvalho e outros materiais, durante 24 horas por dia, havendo o consumo do açúcar do vinho durante a fermentação, sendo o processo finalizado com o engarrafamento do vinho após ser retirado do último tanque. No método *Charmat*, o vinho é submetido à segunda fermentação em tanques de aço inoxidável e é engarrafado sob pressão. Todos eles utilizam leveduras para produzir dióxido de carbono e efervescência. O método tradicional e o contínuo são conhecidos por produzir vinhos semisecos, que não variam muito em aroma e apresentam notas tostadas. No método *Charmat*, os vinhos tendem a apresentar aromas mais doces e florais [1].

Segundo o Regulamento (CE) n.º 491/2009 do Conselho de 25 de maio de 2009, do Conselho da União Europeia, Anexo III - 4, o vinho espumante natural tem que apresentar, quando conservado à temperatura de 20 °C em recipientes fechados, uma sobrepressão igual ou superior a 3 bar. O Anexo III- 5 refere-se a vinho espumante de qualidade, e o mesmo tem que apresentar, quando conservado à temperatura de 20 °C em recipientes fechados, uma sobrepressão igual ou superior a 3,5 bar. Vinho espumante de qualidade aromático é referido no Anexo III – 6, e é exclusivamente obtido utilizando, para a constituição do vinho de base, mostos de uvas ou mostos de uvas parcialmente fermentados provenientes de castas específicas de uva de vinho.

O vinho espumante mais conhecido é o Champanhe, com amplo prestígio, história e elevada produção, associado ao símbolo de *glamour* e qualidade [2], [3]. Apresenta esse nome pois apenas é produzido na região de Champagne-Ardenne, em França, e é um vinho DOC (Denominação de Origem Controlada). É produzido pelo método tradicional e utilizam apenas uvas das castas Chardonnay, Pinot Noir e Pinot Meunier.

A Europa é líder na produção de vinhos espumantes, sendo os maiores produtores a França, Alemanha, Espanha e Itália, com um lote de produção de 65% da produção mundial [4]. Apesar de ser a Europa o maior consumidor de vinhos espumantes, outros estão a surgir, sobretudo dos Estados Unidos e países da Comunidade dos Estados Independentes, como a Rússia. Prevê-se assim que em 2015, os cinco mercados de vinho espumante com maior crescimento sejam a Rússia, Estados Unidos da América, Austrália, Reino Unido e a Ucrânia.

A Itália é o país que lidera as exportações de vinho espumante, seguindo-se a Espanha e a França. Tradicionalmente, o consumo de vinho espumante está associado a celebrações e luxo, no entanto, o aumento do consumo em países anteriormente referidos, uma melhor relação qualidade/preço deste produto e o aumento da diversidade, está a tornar o vinho espumante num vinho de consumo mais regular [5].

### **1.2 - Produção de vinho espumante**

O vinho espumante é resultado de duas fases de produção. Na primeira há a produção de vinho base através da vinificação típica de vinho branco e na segunda há refermentação do vinho base, adicionando açúcar e leveduras, e envelhecimento prolongado do mesmo, em contacto com as borras (envelhecimento *sur lies*). Esta segunda fase é delicada e sem controlo por parte do enólogo [1].

O processo tradicional, adotado durante a realização do trabalho prático, será descrito nos subcapítulos subsequentes e encontra-se esquematizado na Figura 1.

### **1.2.1 - Produção do vinho base: vinificação de brancos**

A qualidade de um vinho espumante depende de um grande número de variáveis, desde a viticultura, solo e clima, variedade das castas usadas e o tipo de técnica de cultivo. A vindima das uvas para a produção de espumantes ocorre, por norma, mais cedo do que a vindima de vinhos de mesa. Assim, é possível obter uvas com uma maior acidez e um pH mais baixo, dois parâmetros importantíssimos que contribuem para a frescura dos espumantes. Obtêm-se também um °Brix (quantidade de sólidos solúveis, por exemplo, açúcares) menor, produzindo vinhos com um teor alcoólico reduzido, o que é desejado em vinhos base, com valores ótimos entre 9 e 10,5% de álcool. As uvas pouco maduras apresentam menor variação de características sensoriais, essencialmente relacionadas com a composição em compostos voláteis e encontram-se normalmente mais saudáveis do ponto de vista sanitário [6].

É possível produzir espumantes a partir de uvas brancas ou tintas, no entanto a maioria é produzida com uvas brancas. Quando são usadas uvas tintas é necessário ter em atenção ao processo de obtenção do mosto de modo a evitar a extração de pigmentos [1], [2], [7]. No processo tradicional de prensagem, as uvas são espremidas inteiras, de forma suave, para evitar a extração de pigmentos, aromas e sabores indesejados das grainhas e engaço, enzimas polifenol oxidases e potássio [8]. Em contrapartida, limita a extração de compostos varietais [6]. O mosto obtido desta primeira prensagem tem o nome de *cuvée*, com maior acidez e conteúdo em açúcares do que as prensagens seguintes, e apresenta um ligeiro potencial para oxidar, o que implica a utilização de dióxido de enxofre [6].

A prensagem de uvas inteiras é mais demorada do que a prensagem de uva trituradas. Daí advém a desvantagem de expor o mosto à oxidação e de formar precipitados castanhos durante a fermentação. A prensagem das uvas inteiras, por prensagem vertical, sem a retirada dos engaços, permite a criação de canais para que o mosto passe, diminuindo a pressão necessária para a extração. No entanto, a prensagem vertical está em desuso, sendo que começaram a ser substituídas por prensas horizontais pneumáticas [1].

Para a produção de vinhos espumantes, 100 kg de uvas produzem cerca de 62,5 L de mosto, sendo que a maioria, 80%, é de *cuvée* [9]. A última fração de mosto, a ser

utilizada para a produção de espumantes, é o *taille*, com menos acidez e com um conteúdo superior em taninos, o que poderá impossibilitar a sua utilização para produzir espumantes [6].

Após a extração do mosto é necessário tratá-lo com sulfito, que apresenta propriedades antimicrobianas e antioxidantes [8] e para além disso limitam a ação das leveduras endógenas, selecionando os microrganismos que irão participar na fase inicial da fermentação. O mosto é então clarificado por método estático (sedimentação 12-24h), onde, por gravidade, as partículas em suspensão vão-se depositando no fundo do tanque [8], método dinâmico (filtração ou centrifugação), e em ambos, o nível de acidez e açúcares é acertado [1].

Os níveis de acidez e pH são parâmetros importantes na produção de vinhos, não só por contribuírem para um aroma fresco do vinho e protegerem a estabilidade da cor, mas também por terem um papel determinante para o envelhecimento do vinho e prevenir a deterioração microbiana. Um valor elevado de pH está associado a uma baixa acidez, e é corrigido por acidificação direta, adicionando ácido tartárico, que reduz o pH promovendo a precipitação do excesso de potássio, na forma de sal de bitartarato. O ácido tartárico é preferencialmente usado por apresentar resistência à deterioração microbiana, no entanto, existem outras alternativas ao uso de ácido tartárico para a realização de acidificação, como a aplicação de ácido láctico ou ácido cítrico [7].

A primeira fermentação é iniciada pelas culturas *starter Saccharomyces cerevisiae*, na dose aproximada de  $10^6$  células.  $L^{-1}$  [10]. Estas leveduras são comercializadas liofilizadas, sob a forma de pó. A vantagem de usar culturas puras é que, desta forma os produtores conseguem produzir vinhos com características semelhantes de ano para ano, realizando a fermentação em condições idênticas, e ainda previnem desta forma o problema das fermentações espontâneas [8].

É recomendável que a fermentação ocorra em tanques com temperatura controlada, como o caso de cubas de dupla camisa de frio [1], a temperaturas entre os 15-18 °C [8]. Desse modo, limitam-se as perdas de compostos voláteis que poderão ser importantes para o aroma do vinho. A fermentação está completa quando o açúcar for consumido pelas leveduras até um valor residual de 1,5g.  $L^{-1}$ . O nível de açúcares residual deve ser

analisado após a fermentação, pois pequenas concentrações de açúcar podem comprometer a estabilidade microbiana do vinho [7].

O vinho, após a primeira fermentação, necessita de ser estabilizado e clarificado para produzir vinhos brilhantes e límpidos. A instabilidade dos vinhos é causada pela presença de potássio proveniente da maceração, que diminuem a sua capacidade de solubilizar com o aumento do conteúdo alcoólico, podendo formar precipitados. A eletrodialise é uma das técnicas utilizadas para a estabilização bitartáricas, e consiste na passagem do vinho por membranas eletricamente carregadas, impedindo seletivamente a passagem de íons de carga oposta, removendo assim os cátions e aniões. Os íons de potássio são mais rapidamente removidos que os íons de tartarato, limitando a cristalização e fazendo baixar o pH. A redução do teor de potássio em cerca de 10% permite que os vinhos apresentem a estabilidade bitartárica adequada. Como as correntes de membranas da eletrodialise atuais não são suficientemente seletiva, o dióxido de enxofre e o cálcio podem também ser removidos [11]. É também de esperar que o ião malato, anião de ácido málico, possa ser removido, devido à semelhança do ião malato com o ião do anião do ácido tartárico [12].

A clarificação envolve processos físicos para a remoção de material em suspensão. Após a segunda fermentação é necessário remover o material que se sedimenta espontaneamente, através de centrifugação ou filtração. A filtração envolve a retenção dos sedimentos em material fibroso ou poroso. Dependendo do poro usado na filtração, pode ser possível remover partículas maiores que 100  $\mu\text{m}$  até partículas e íons de diâmetro até  $10^{-3}$   $\mu\text{m}$  [11]. A filtração com poros apertados não é desejável em vinhos base para espumantes, visto removerem proteínas e polissacarídeos que apresentam um papel proeminente na formação e estabilidade da espuma [6].

### **1.2.2 - Segunda fermentação**

A refermentação é a chave para a produção do vinho espumante. Nesta fase é formado o dióxido de carbono, criando assim a espuma e a efervescência característica

deste vinho, após o mesmo ser derramado na *flute*. Esta etapa de produção de espumantes é conhecida como a fase *prise de mousse*.

Como os açúcares presentes no mosto foram metabolizados durante a primeira fermentação, é necessário executar a tiragem que envolve a adição de um concentrado de uma solução de 50-65 % de sacarose e outros nutrientes, para alimentar as leveduras a serem inoculadas, sendo a maior parte das vezes o próprio vinho usado como solvente [6]. Uma tiragem eficiente assegura 24g de sacarose por litro de vinho, conduzindo à formação de 6 atmosferas de pressão a 20 °C. Normalmente, durante a segunda fermentação, são requeridas 4,2g de sacarose para gerar 2g de dióxido de carbono, e o teor alcoólico aumenta 1% [6].

É necessário adicionar tiamina e azoto (DAP- Diamónio hidrogénio fosfato), frequentemente nas doses de 0,5 e 100 mg. L<sup>-1</sup>, respetivamente. A tiamina desempenha o papel de contornar o problema da inibição de captação de açúcar pelas leveduras pela presença de etanol, enquanto o DAP é necessário caso a concentração de azoto assimilável ser menor do que 15 mg. L<sup>-1</sup>. Caso os vinhos de base não tenham sido submetidos a fermentação malolática, estes devem ser estéreo filtrados, recorrendo à adição de dióxido de enxofre [6].

As leveduras inoculadas na segunda fermentação são normalmente *S. cerevisiae*, a uma concentração de  $3-4 \times 10^6$  células. mL<sup>-1</sup> (2–5% do volume da tiragem) [6]. A utilização de leveduras imobilizadas está a aumentar pela vantagem de se depositarem facilmente no fundo da garrafa, não havendo a necessidade de *remuage*, processo que promove o depósito das borras, colocando as garrafas em pepitras e rodando-as para promover a formação de depósito, tornando assim o processo mais facilitado e sem necessidade de tanta mão de obra. As cápsulas com leveduras imobilizadas são formadas usando normalmente o alginato, e cada cápsula alberga centenas de leveduras [13].

Após a adição do licor de tiragem e inoculação das leveduras, o vinho é então engarrafado e hermeticamente selado, através da inserção de plástico *bidule*, e encapsulados com uma coroa de metal. As garrafas são produzidas de modo a resistirem às pressões de dióxido de carbono [1]. O vinho é acondicionado a temperaturas estáveis, na ordem dos 10 – 15 °C [6]. A velocidade da fermentação depende da estirpe de levedura utilizada, demorando cerca de 3 meses até estar terminada [1].



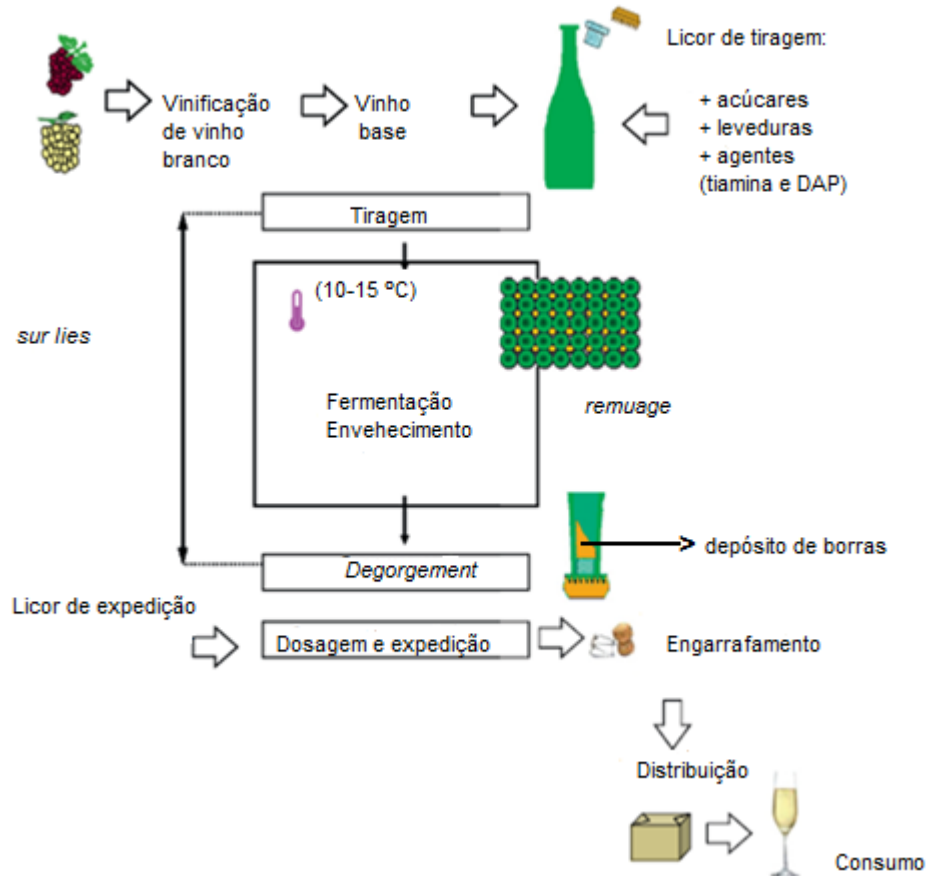
Durante a maturação, há o contato das leveduras com o vinho, no mínimo durante 9 meses, mas pode prolongar-se por três ou mais anos, dependendo das características desejadas no vinho. Para a produção de efervescência e de estabilidade da espuma, uma maturação durante 18 meses parece ser a ideal. As propriedades da espuma estão principalmente correlacionadas com a presença de polissacarídeos provenientes da autólise das leveduras [6].

A última fase do processo é a expedição. É nesta fase em que o produto fica acabado, é realizada a rotulagem, o rolhamento e as borras são retiradas. Para isso é necessário uma prévia *remuage* para promover a floculação e para que as borras se depositem no gargalo da garrafa. Tradicionalmente as garrafas são colocadas em pepitras, onde as garrafas se encontram com o gargalo voltado para baixo e se encontram inclinadas (25 - 30 °). As garrafas são rodadas 1/8 de volta, e a sua inclinação vai aumentando. No final as garrafas são invertidas, e as borras encontram-se depositadas no gargalo. O processo tradicional começou a cair em desuso, e hoje em dia são utilizados adjuvantes de sedimentação e máquinas que simulam os movimentos manuais [1].

O *degorgement* ocorre em conjunto com a adição do licor de expedição. O gargalo das garrafas, apontadas para baixo, é mergulhado num banho de etileno glicol que congelam os sedimentos. Quando a garrafa é invertida e aberta, a rolha de gelo sai juntamente com a tampa. É imediatamente adicionado o licor de expedição, que, de acordo com a Regulamentação Europeia, refere-se ao produto adicionado aos espumantes, de modo a conferir-lhes atributos diferentes, dependendo essencialmente da quantidade de açúcar adicionado. Os vinhos espumantes podem ser classificados segundo o seu teor em açúcares, expresso pela soma das concentrações de frutose e glucose. Essa classificação é regida pelo Regulamento (CE) nº 607/2009, Anexo XIV - Parte A, da Comissão das Comunidades Europeias. Os vinhos espumantes podem então ser: "bruto natural" com concentração de açúcares abaixo de 3 g. L<sup>-1</sup>, e a estes não pode ser adicionado açúcar após a fermentação; "extra bruto" com concentrações entre 0 - 6 g. L<sup>-1</sup>; "bruto" com valores inferiores a 12 g. L<sup>-1</sup>; "extra seco" 12 - 17 g. L<sup>-1</sup>; "seco" 17 - 32 g. L<sup>-1</sup>; "meio seco" 32 - 50 g. L<sup>-1</sup>, e finalmente "doce", com concentrações superiores a 50 g. L<sup>-1</sup>. O licor de expedição pode ser composto por sacarose, mosto, mosto em fermentação, concentrados de sumo de uva, concentrado de sumo de uva corrigido, vinho, ou uma mistura. A aplicação

## Avaliação do efeito da adição de vários produtos enológicos na espuma do vinho espumante

do licor de tiragem não pode aumentar o teor alcoólico em mais de 0,5% por volume [1]. A fase final inclui a o rolhamento final, colocação de cápsula, arame e rotulagem.



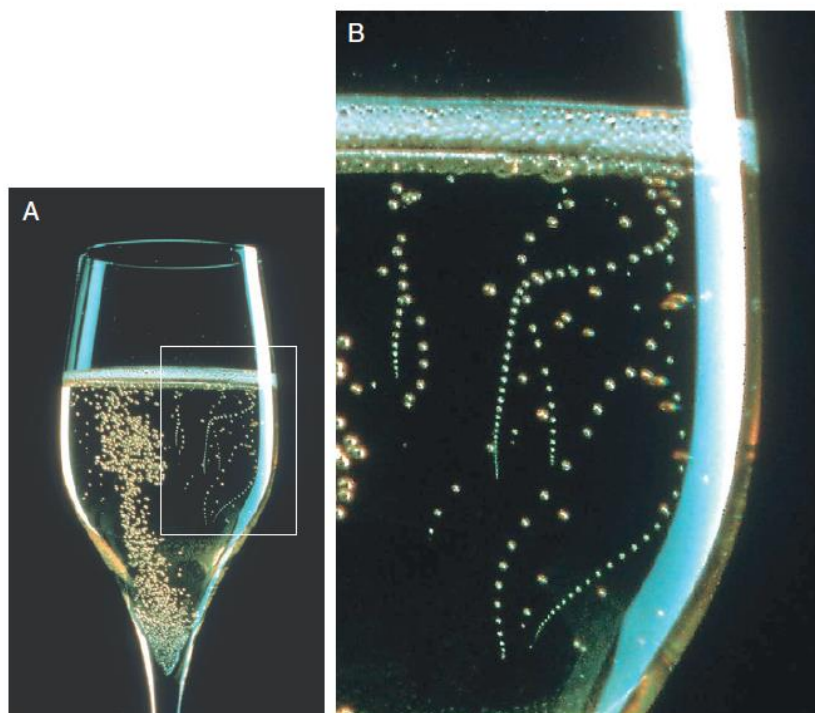
**Figura 1** - Esquema de elaboração de vinho espumante pelo método tradicional [1].

### 1.3 - Características da espuma dos vinhos espumantes

As características sensoriais mais importantes dos vinhos espumantes incluem, sem dúvida, as propriedades da espuma percebidas pelo consumidor ao servir o vinho espumante e também quando o bebe.

Uma espuma de qualidade pode ser definida como aquela que causa uma libertação lenta do CO<sub>2</sub> em forma de anel, a partir do fundo do líquido, com pequenas bolhas que contribuem para a formação de uma coroa ao longo da superfície do vinho, cobrindo-o completamente, com bolhas de duas três fileiras de profundidade. A permanência da

espuma sobre a superfície do vinho depende do equilíbrio entre a velocidade de formação de espuma e a velocidade à qual as bolhas que compõem esta camada são destruídas [14].



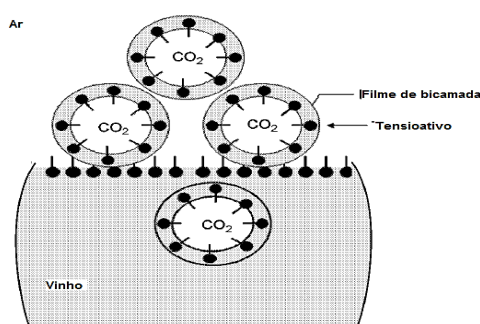
**Figura 2** - Fotografia de *flute* típica de vinho espumante (A) e um *close-up* dos locais de nucleação da bolha (B) [15].

Comelles *et al* (1991) propõe uma definição de espuma em enologia: “um grupo de pequenas bolha, composta por uma película de líquido em forma de esfera, que envolve o gás CO<sub>2</sub> endógeno produzido na segunda fermentação”.

As bolhas sobem através do líquido e acumulam-se à superfície do vinho ou na interfase líquido/ar. As bolhas são compostas internamente por CO<sub>2</sub>, rodeadas por um filme líquido de vinho, criando uma camada dupla (Figura 3).

Este filme de líquido dá a bolha a sua forma esférica e mantém estável por algum tempo e separando-a das outras bolhas, evitando a coalescência de bolhas e a sua rotura [1],15].

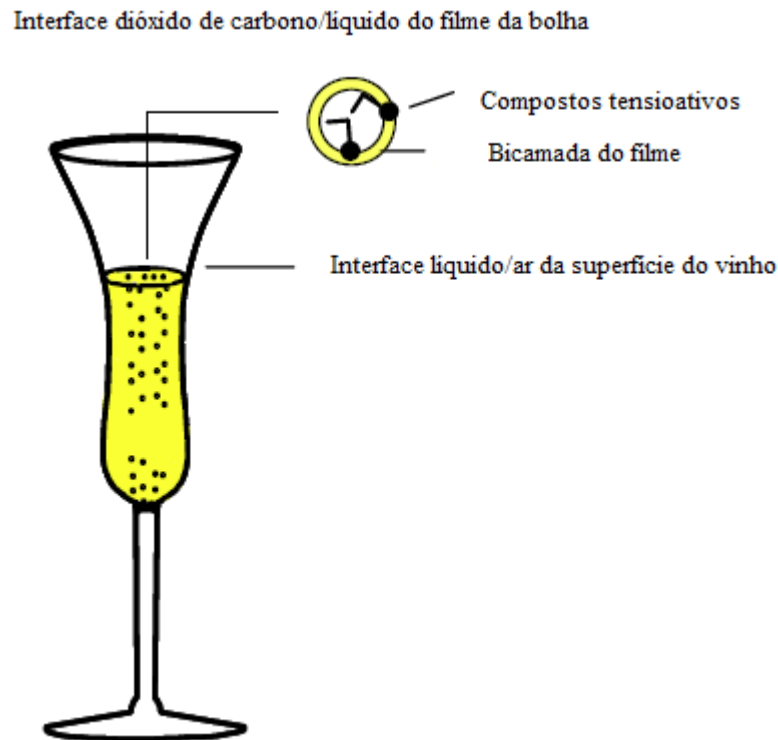
A estabilidade da espuma depende do tempo de vida médio das bolhas que a compõe e está relacionado com vários fatores, desde a viscosidade da película, nucleação e crescimento da bolha, difusão de gás entre as bolhas e concentração de compostos tensioativos [1], [17] no entanto, os compostos diretamente envolvidos na formação e estabilização da mesma ainda não estão completamente descritos e estabelecidos [18].



**Figura 3** - Esquema das bolhas e formação da espuma, com o interior com  $\text{CO}_2$ , rodeado por uma película de líquido ou vinho, criando uma camada dupla estabilizada por tensioativos[16].

A estrutura das bolhas que se formam na base do vinho e o aparecimento de espuma na sua superfície são fenómenos que requerem a supersaturação de  $\text{CO}_2$  e a presença de compostos no vinho capazes de constituir a película que confere às bolhas a sua individualidade. Nenhuma espuma é produzida em líquidos que contêm  $\text{CO}_2$  sob pressão (águas com gás ou refrigerantes). A presença de compostos com propriedades tensioativas nos vinhos espumantes é o que dá às bolhas uma forma quase esférica (Figura 3). Além disso, os compostos tensioativos encontrados no vinho reduzem a tensão superficial, o que torna mais fácil as bolhas ascenderem à superfície. Em meio aquoso, o grupo polar da molécula do composto tensioativo dissolve-se facilmente, enquanto o grupo hidrofóbico é absorvido na interfase líquido/ar da superfície do vinho ou na interfase gás/líquido do filme da bolha (Figura 4). No primeiro caso, os compostos tensioativos reduzem a tensão superficial do líquido, tornando assim mais fácil para as bolhas de superarem a atração exercida pelas moléculas dentro do vinho durante a sua subida para a superfície. No segundo caso, os compostos tensioativos concentram-se no filme da bolha,

empurrando o grupo hidrofóbico para o gás, o que favorece a entrada de gás impedindo que o  $\text{CO}_2$  se dissolva na massa líquida [16].



**Figura 4** - Esboço da bolha e a representação interface [1].

A espuma produzida por um vinho espumante quando é vertida para um copo consiste em duas fases. A primeira fase consiste em espuma tumultuada que sobe vários centímetros ao longo da parede de vidro, devido a rápida descompressão que acontece depois que a garrafa é aberta. Esta explosão de espuma dura apenas alguns segundos e é principalmente composta por microbolhas que se formaram e aumentaram de tamanho durante a agitação, transporte e desenrolhar da garrafa [16]. Logo depois, a espuma é reduzida a apenas alguns milímetros e uma segunda fase, mas mais duradoura tem início. Inicialmente uma, duas ou várias camadas de espuma distribuídas através da superfície do vidro são formadas. Estas camadas são geradas por várias filas de bolhas que se formam a partir das microcavidades. Quando a temperatura do vinho espumante sobe, devido à temperatura ambiente existente, o etanol presente na superfície do vidro começa a evaporar

em maiores quantidades do que o etanol presente no centro fazendo com que a tensão superficial do vinho seja superior no centro do que em torno da circunferência, conseqüentemente, é formado um gradiente de bolhas no centro para a coroa, onde é mais fácil para bolhas alcançarem a superfície, uma vez que a tensão superficial nesta área é menor [16]. Nesta segunda fase, a intensidade da espuma vai gradualmente diminuindo ao longo do tempo, devido à perda de CO<sub>2</sub> dissolvido, devido ao aumento da temperatura e o efeito de arrastamento físico causado por efervescência [16].

A duração da espuma está diretamente relacionada à estabilidade da bolha, e a estabilidade é dependente da composição química da película que a suporta. A película atua como uma barreira elástica formada não apenas por compostos tensioativos (proteínas, polissacarídeos, ácidos gordos), mas também por outros compostos entre outros, que conferem ao filme as suas propriedades elásticas e viscosas [16]. A viscosidade da superfície da parede da bolha, que faz parte da espuma, está relacionada com a viscosidade do vinho e afecta as suas propriedades espumantes [16]. Quando a bolha está na superfície do vinho esta perde o líquido a partir do filme da bolha, ao longo do tempo, devido à gravidade e diferenças de pressão e/ou evaporação. Assim, o tempo é fator que reduz a espessura do filme devido à drenagem do líquido. Este efeito de drenagem gravitacional torna a parede da bolha mais frágil e fina e, conseqüentemente, mais propensos à ruptura ou colapso [16]. De acordo com Kinsella (1981), uma elevada viscosidade atenua os efeitos destrutivos da colisão entre bolhas. Em resumo, um elevado teor de coloides no vinho vai traduzir-se em um filme mais viscoso que resulta numa perda lenta de líquido, que levam a um aumento da meia vida de bolha e aumento da estabilidade da espuma [16], [17].

Vários estudos foram realizados na tentativa de estabelecer os compostos que influenciam as propriedades de espuma, nomeadamente a quantidade e estabilidade. Um dos compostos que mais consenso teve nos estudos como um contribuinte positivo para as propriedades de espuma foram as proteínas [18], [20]–[22]. Outros compostos também têm demonstrado efeitos positivos na formação de espuma, como polissacarídeos [18], [20], [22]. À glucose também tem sido atribuída efeitos benéficos na formação de espuma [21], [23], [24]. Núñez *et al* (2006) demonstraram que as manoproteínas das paredes das

leveduras também contribuíam para o aumento das qualidades da espuma, nomeadamente o aumento da estabilidade da mesma.

Existem também compostos que apresentam um efeito negativo na qualidade da espuma, como os lípidos, onde esse efeito parece dever-se essencialmente ao estado físico da micela lipídica [25]. Gallart *et al.*, (2002) demonstraram que os ácidos gordos C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> e C<sub>12</sub>, prejudicavam a qualidade da espuma. No entanto outros podem ajudar no seu melhoramento, como o ácido linoleico, quando não se encontra no estado livre [23]. Estudos realizados para estabelecer os efeitos de diferentes variáveis tecnológicas aplicadas na produção do vinho e a qualidade de formação de espuma concluíram que os tratamentos de estabilização, quer por clarificadores, quer por filtrações, afetavam negativamente a espuma dos vinhos, devido à redução de proteínas durante o processo [20], [27], [28].

### **1.3.1 - Bolhas**

Formação de bolhas nos vinhos espumantes ocorre como um resultado de dois mecanismos principais. O primeiro mecanismo tem a ver com a formação de microbolhas no vinho quando ele é submetido a agitação durante o manuseamento e transporte [29], [30]. À medida que a pressão na garrafa diminui, depois de ser desrolhada, as microbolhas continuam a crescer até rebentar, dando assim aos centros de nucleação a oportunidade de formar novas microbolhas. Estas novas microbolhas, por sua vez crescem e rebentam, dando origem a mais microbolhas, formando uma cadeia de bolhas, processo conhecido por nucleação homogénea induzida [30]. A formação da bolha é também causada pela presença partículas endógenas, tais como a presença de pó de cortiça, quando utilizadas rolhas desse material, por macromoléculas que retêm gás tal como agentes de clarificação (bentonite) e por vestígios de células de levedura, mas principalmente pela presença de microcavidades semelhantes aos do bitartarato de potássio ou aqueles encontrados em paredes de vidro com defeitos. Quando a microcavidade é protegida por um camada lipofílica, que impede que esta fique cheia com o vinho, pode tornar-se completa de gás devido à capilaridade, que dá origem a uma bolha recém formada, que continua o seu

volume até que seja submetido a forças gravitacionais ascendentes [16], [31]. No entanto, para que uma microcavidade possa albergar uma bolha embrionária é necessário que esta tenha um raio de curvatura de tal modo que a pressão da bolha impeça a difusão e a redissolução do CO<sub>2</sub> no vinho [16], [32].

Quando a bolha cresce até um tamanho adequado para deixar a microcavidade há a possibilidade para que outra bolha cresça (nucleação heterogênea induzida). A principal diferença entre os dois tipos de nucleação é que no homogêneo, uma única bolha é produzido, e na nucleação heterogênea, as microcavidades podem continuar a produzir centenas de bolhas durante algum tempo [16], [29].

As bolhas que se mantêm estáveis na superfície do vinho ou na interfase líquido/ar unem-se para formar uma camada que cobre a superfície ou concentrar-se frequentemente na área superficial do vinho em torno ou em contacto com a parede de vidro. Esta primeira monocamada é deslocada por uma segunda camada, e assim sucessivamente. Esta aglomeração de diferentes camadas de espuma é conhecida como uma espuma, e a concentração de bolhas em torno da circunferência do vinho delimitados pela borda de vidro é conhecida como a coroa [16].

As bolhas apresentam também um ciclo de vida, constituído por três fases: nascimento, ascensão e colapso. A abertura da garrafa de espumante conduz a um desequilíbrio termodinâmico devido à sobrepressão de CO<sub>2</sub>, para que o equilíbrio volte a ser estabelecido, agora sobre as condições de pressão atmosférica, o CO<sub>2</sub> tem de abandonar o líquido [33], [34].

### **1.3.2 - Efervescência**

A efervescência é o fenómeno de ascensão das bolhas através do vinho. Nos espumantes existem dois tipos de efervescência, tumultuosa e lenta. A tumultuosa é gerada quando o vinho é despejado no vidro imediatamente após a abertura da garrafa, iniciando descompressão instantânea. Essa efervescência é causada principalmente pelas microbolhas que se formaram no vinho durante o seu manuseio e transporte [29], [35]. A



espuma durante uma efervescência tumultuosa sobe alguns centímetros no vidro, mas a altura da espuma desmorona rapidamente de volta para alguns milímetros. Esta é a espuma que permanece na superfície [36].

Quando as bolhas atingem a superfície, elas vencem a tensão superficial, havendo a formação de uma camada que inicialmente cobre toda a superfície. Dependendo dos centros de nucleação que se desenvolvem, haverá uma, duas, ou mais camadas de espuma. A formação de bolhas depende de um fator importante, a temperatura do vinho. Quanto mais baixa a temperatura estiver, maior é a quantidade de gás de dióxido de carbono capaz de permanecer dissolvido no vinho, sendo a taxa de libertação mais lenta, tornando a efervescência mais duradoura. A forma como a garrafa é aberta, como o vinho é despejado, o tipo de limpeza, secagem de vidro e forma da *flute* podem influenciar toda a espuma e a sua efervescência [1].

Casey (1988) definiu que o tipo de copo mais apropriado para beber vinho espumante é de vidro e em forma de *flute*, porque dispõe de uma pequena superfície para o gás escapar e reduz a evaporação do etanol. Apresenta uma perda de compostos voláteis reduzida, enquanto a efervescência e espuma são prolongadas [1]. Os copos de vinho produzidos especialmente para espumantes possuem pequenos arranhões no interior, agindo como microporos para proporcionar a nucleação heterogênea [33].

### **1.3.3 - Papel das proteínas e polissacarídeos na espumabilidade**

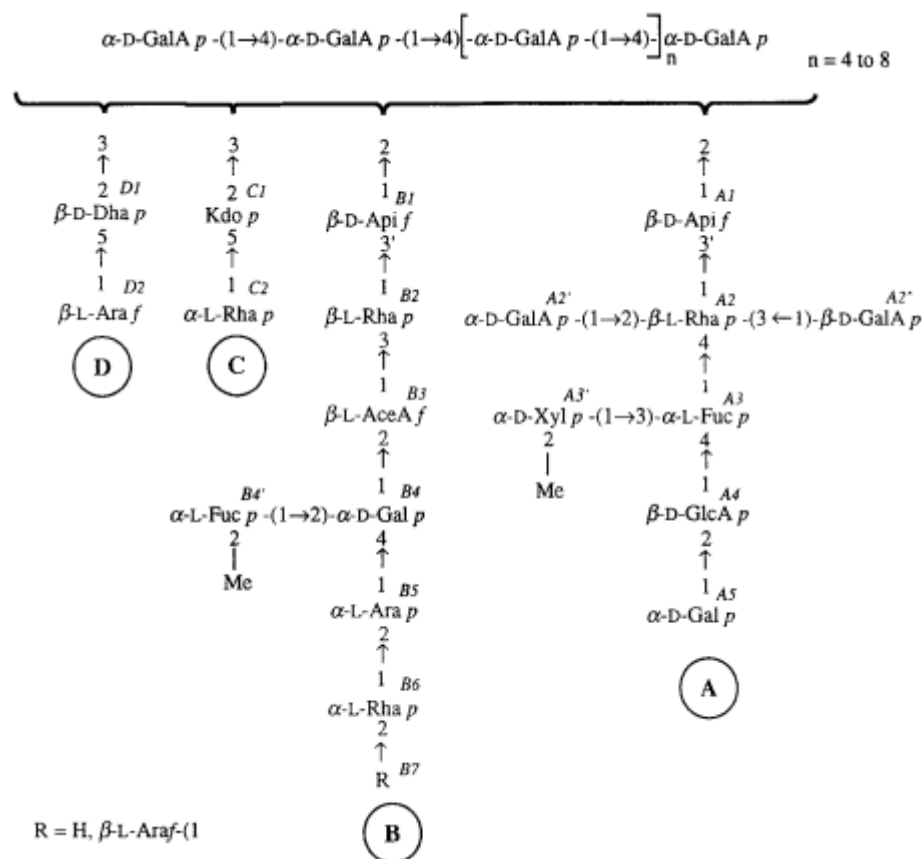
As propriedades da espuma dos vinhos espumantes estão intimamente relacionados com a sua composição química, que, por sua vez, dependem de vários fatores, tais como a origem das uvas, maturidade da mesma e práticas enológicas. Tudo indica que a estabilidade da espuma é favorecida significativamente pela presença de agentes tensioativos que podem estabilizar a espuma, pois conseguem fixar-se ao filme da bolha, onde a sua porção hidrofóbica fica voltada para o gás e a cauda hidrofílica fica voltada para a fase aquosa. As proteínas e polissacarídeos são das substâncias formadoras de espuma que parecem desempenhar um papel mais importante, devido às suas propriedades [37].

As proteínas do vinho são relativamente pequenas, com pesos moleculares (MW) entre os 9,6 e 60 kDa, com características acídicas e apresentam ponto isoelétrico entre 3,5 e 7,6. As principais proteínas do vinho são: taumatina (MW de cerca de 24 kDa), quitinases (MW de cerca de 30 kDa) e a invertase (MW cerca de 60 kDa). Nem todas as proteínas contribuem igualmente para as propriedades de formação de espuma dos vinhos. Tem sido demonstrado que as proteínas hidrofóbicas apresentam um contributo maior na formação de espuma que as proteínas hidrofílicas. Assim sendo, a taumatina e a invertase (proteínas hidrofóbicas) apresentam-se envolvidas em mecanismos de promoção de espuma em vinhos, ao passo que as proteínas hidrofílicas quitinases não apresentam qualquer efeito [37].

Algumas proteínas são as responsáveis pelo aparecimento de turbidez nos vinhos, tais como a taumatina,  $\beta$ -(1,3)-glucanases e quitinases. Para minimizar esse possível problema é utilizada bentonite, no entanto pode haver efeitos adversos com a aplicação deste produto, pois a sua ação aplicação pode eliminar algumas das proteínas que contribuem para a formação de espuma. As proteínas, na presença de polissacarídeos pépticos e arabinogalactanas, tornam mais fácil o processo de clarificação, pois aumentam a intensidade da turbidez, ao passo que os polissacarídeos neutros não apresentam esse efeito [37].

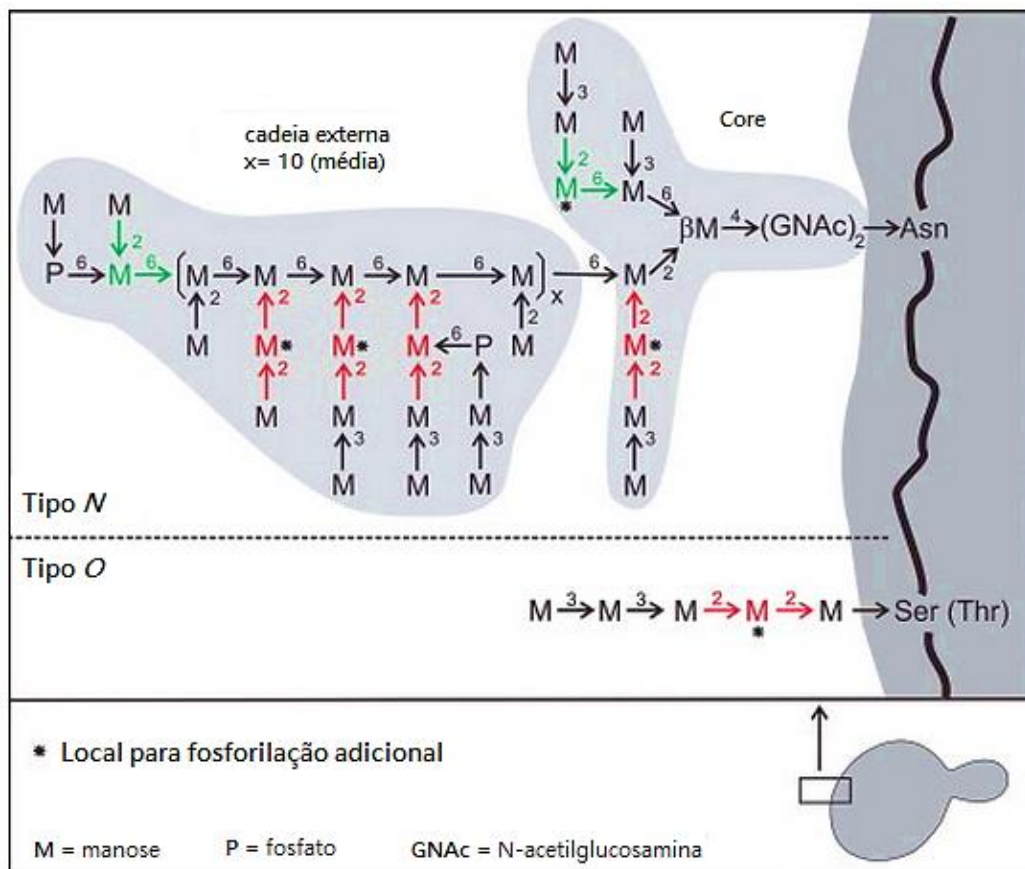
Os polissacarídeos encontrados nos vinhos podem ser provenientes das uvas ou da autólise de leveduras. Existem vários polissacarídeos provenientes das uvas, mas a maioria é degradada enzimaticamente ou precipitada durante a fermentação alcoólica, por isso, apenas dois tipos se encontram em quantidades apreciáveis no vinho, são eles as arabinogalactanas ligadas a proteínas (AGP) e as ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II) (Coelho, E., 2010). Estes dois compostos aumentam a percepção do “corpo” do vinho. As ramnogalacturonanas também podem reduzir a adstringência provocada pelos ácidos orgânicos. [38]. As arabinogalactanas (AGs) e as AGPs são constituídas por uma cadeia principal de galactose com ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), com cadeias laterais ramificadas de galactose em ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) substituídas por resíduos de  $\alpha$ -arabinofuranose. As RG-II, como observado na Figura 5, são polissacarídeos que contém 12 resíduos glicosídicos diferentes, tais como apiose, arabinose, galactose, 2-O-metil-L-fucose, 2-O-metil-D-xilose, ácido 3-desoxi-D-lixo-2-heptulosárico, 3-desoxi-D-mano-octulosico, entre outros e a cadeia

principal é formada por resíduos de ácido galacturônico em ligação  $\alpha$ -(1→4) [34], [39], [40]. As arabinanas constituídas principalmente por cadeias curtas de arabinose ligadas em  $\alpha$ -(1→5) também podem estar presentes nos vinhos em pequenas quantidades [40]. Os vinhos provenientes de uvas infetadas com o fungo *Botrytis cinerea* podem ter uma menor capacidade de espumabilidade. Uma das possíveis causas deste fenómeno é a provável libertação de proteases pelo fungo, que degradam as proteínas das uvas, ficando os hidrolisados resultantes dissolvidos no mosto [37]. O *B. cinerea* também tem influência na concentração de polissacarídeos presente nos vinhos, pois este fungo liberta, por autólise, grandes quantidades de  $\beta$ -glucanas [34], [37].



**Figura 5** - Estrutura hipotética de RG-II. A figura mostra as quatro cadeias laterais (A-D) oligoglicosídicas cujos resíduos são numerados de acordo com a sequência modelo [40].

As manoproteínas são outro dos grandes grupos de polissacarídeos presentes no vinho, tendo origem nas paredes celulares de *S. cerevisiae*, representando 32,2% do total de polissacarídeos presentes em vinhos brancos [41]. As paredes celulares da *Saccharomyces* são constituídas, essencialmente, glucanas (com ligações  $\beta$ -(1,3) e  $\beta$ -(1,6)), quitina e manoproteínas, (com um peso molecular entre 20 a 450 kDa), interligados por ligações covalentes e não covalentes. A cadeia peptídica é ligada a cadeias laterais curtas, constituídas por 4 unidades de manose e uma cadeia ramificada de  $\alpha$ -D-manose, unidas a proteínas por ligações do tipo *O* ou *N* (Figura 6) [42]–[44]. A rotura destas estruturas após a morte celular da levedura envolve a ação de  $\beta$ -glucanases endógenas, que se encontram nas paredes das leveduras até 4 meses após a morte celular das mesmas, e manosidades [45], que podem hidrolisar as ligações  $\beta$ -O-glicosídicas de cadeias  $\beta$ -glucanas, levando à liberação de glucose e oligossacarídeos [46]. Estas enzimas são muito ativas durante a fermentação alcoólica e, a um nível inferior, durante vários meses após a morte das células de levedura [47]. A utilização de preparados comerciais contendo estas enzimas mostram-se por isso eficazes no melhoramento deste processo [45], [48]. Não se sabe ainda muito sobre a influência dos polissacarídeos das uvas sobre a espuma, no entanto, os polissacarídeos provenientes da autólise das leveduras revelam efeitos positivos, especialmente durante o envelhecimento após a segunda fermentação em garrafa de vinhos espumantes[37], [49].



**Figura 6** - Manoproteínas de *S. cerevisiae* com ligação a proteína tipo N e O [50].

As manoproteínas também evitam a precipitação tartárica, afetando a taxa de crescimento de cristais. Têm capacidade absorviva sobre locais de crescimento do cristal, bloqueando assim a integração de novas unidades na rede cristalina [51]. As manoproteínas contribuem para o paladar do vinho e são capazes de interagir com os compostos voláteis responsáveis pelo aroma do vinho. Pensa-se que as manoproteínas são capazes de promover o crescimento de bactérias lácticas e diminuir a adstringência e amargura de taninos. Em geral, vinhos mais ricos em polissacarídeos, libertados por leveduras, são descritos na análise sensorial como sendo mais suaves e com maior corpo [51].

### 1.3.4 - Compostos fenólicos e cor

A maioria dos compostos fenólicos encontrados na película da uva são os principais responsáveis pela cor do vinho. São metabolitos secundários sintetizados pela planta para se proteger de situações de *stress*. No caso do vinho, os compostos fenólicos fornecem cor, mas também afetam outras propriedades sensoriais, como o sabor, adstringência e odor. Esta família de compostos é caracterizada por ter, pelo menos, um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo como substituintes. São classificadas em dois grandes grupos: não flavonóides e flavonóides. Os não flavonóides são distribuídos na película e polpa da uva e tem apenas um núcleo fenólico (chamado ácido fenólico, tais como ácidos cinâmico e ácido benzóico) ou dois núcleos fenólicos ligados por uma cadeia insaturada (estilbenos) [27].

Os compostos fenólicos têm sido extensivamente estudados, tanto para descrever as diferentes variedades existentes destes compostos como para estudar a sua influência sobre as propriedades organolépticas do vinho como a cor e para avaliar as suas propriedades antimicrobianas, anticancerígenas e antioxidante.

Os compostos fenólicos mais abundantes encontrados nos espumantes são os ácidos hidroxicinâmicos, especialmente o ácido caftarico, e o polifenol tirosol. Os flavonóides detetados foram as catequinas e, em menor proporção, miquelianina (quercetina 3-*O*-glucuronido) [27].

### 1.3.5 - Aroma e compostos voláteis

A constituição dos compostos voláteis que dão origem ao aroma dos vinhos espumante dependem, em grande parte, das castas utilizadas e à forma como a segunda fermentação ocorre (garrafa ou tanque). Considerando que o envelhecimento ocorre na garrafa, como é o caso de *Cava* ou *Champagne*, o fator mais influente durante a elaboração do vinho é autólise de leveduras.

Os compostos voláteis responsáveis pelo aroma dos vinhos espumantes provêm de várias famílias de compostos voláteis, incluindo álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, ácidos voláteis, terpenóides e pirazinas, com concentrações variáveis. Estes compostos têm várias origens, e os aromas que geram podem ser classificados em três grupos de acordo com a origem: a partir da uva, a partir de fermentação, ou a partir de processos que ocorrem durante o envelhecimento. O aroma varietal é derivado da composição das uvas, de compostos como monoterpenóides, sesquiterpenóides e norisoprenóides em  $C_{13}$  [52]. O aroma fermentativo é gerado pela atividade metabólica das leveduras durante fermentação. Os compostos mais abundantes formados durante esta fase são álcoois, ésteres, ácidos gordos, e aldeídos. O aroma terciário evolui à medida que os compostos gerados durante a fermentação são transformados pelo envelhecimento [2].

Durante o envelhecimento há um enriquecimento em componentes fornecidos pelas borras (nucleótidos, aminoácidos, oligossacarídeos, ácidos gordos, compostos voláteis e vitaminas) [53]. Para além disso, os processos químicos e bioquímicos entre o vinho e a levedura, apesar de ainda pouco compreendidos, contribuem para as características de aroma do vinho espumante [2], [53], [54]. A autólise das leveduras, para além de provocar alterações na estrutura celular, altera a composição volátil dos vinhos, mais do que a casta usada [28].

As borras desempenham um papel sensorial interativo, essencialmente em relação aos ésteres. Os ésteres de cadeia longa são particularmente retidos nas paredes de células de levedura [36], sendo os de cadeia pequena, como os ésteres etílicos de ácidos alifáticos (principalmente acetato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, e decanoato de etilo) grandes responsáveis no perfil de aroma dos vinhos espumantes. Outros ésteres característicos presentes são o etil-9-decenoato, lactato de etilo e succinato de dietilo.

Compostos terpénicos, como a citrionelol, lactonas, como a decalactona e norisoprenoides em  $C_{13}$ , como a  $\beta$ -damascenona são encontradas em vinhos envelhecidos, e a presença desses compostos é desejável, já que enriquecem os vinhos com notas florais e frutadas [55]. A atividade enzimática é a provável responsável pela libertação de vários compostos a partir de precursores glicosilados [36].

Os furanos são compostos derivados da degradação do açúcar, através da reação de Maillard. Estes compostos são parcialmente responsáveis pelas notas fermentadas e tostadas do vinho [36].

Os compostos de enxofre, da família dos tióis, desempenham um papel importante no sabor dos vinhos espumantes. Têm diferentes propriedades sensoriais, dependendo da posição do átomo de enxofre nas moléculas e respetivas concentrações. A maioria deles, como o caso do sulfeto de hidrogénio, faz uma contribuição sensorial negativa, com aromas descritores como repolho, ovo podre, sulfuroso, alho, cebola, e borracha. No entanto, alguns compostos de enxofre, como o mercaptohexanol, contribuem com aromas agradáveis de morango, maracujá, e notas de madeira [36], [56].

### **1.4 - Biotecnologia aplicada à produção de vinhos espumantes**

Nos últimos anos tem havido uma inovação nas técnicas de produção de vinho, abrangendo todas as fases de produção, no entanto incidindo mais na etapa fermentativa [45], [57].

Na enologia, o conhecimento biotecnológico pode muito bem tornar-se cada vez mais importante. O uso de microrganismos associados ao processo de fermentação, uso de preparados enológicos de leveduras inativas e uso de enzimas durante a prensagem das uvas, tratamento do mosto, pré fermentações e refinamentos pós fermentativos dos vinhos revelam-se cada mais vantajosos[45].

#### **1.4.1 - Seleção de linhagens de levedura**

A autólise no vinho é um processo demorado, podendo em alguns casos durar anos. Assim, no sentido prático, o uso de linhagens de leveduras capazes de realizar a autólise num tempo mais curto seria altamente vantajoso. Uma forma de atingir esse objetivo é recorrer a melhoramentos genéticos de modo a criar linhagens de leveduras com uma



elevada capacidade autolítica. Estas leveduras têm uma autólise rápida sem recurso ao aumento da temperatura e para além disso torna a adição de autolisados de levedura desnecessária.

### 1.4.1.1 - Linhagens com capacidade floculativa

As leveduras que realizam fermentações secundárias (segunda fermentação) devem possuir uma série de características adicionais quando comparadas com as utilizadas durante a primeira fermentação, para produção de vinho base. Para além de terem de apresentar resistência ao etanol devem também ter uma elevada capacidade de floculação, de modo a facilitar a sua eliminação da garrafa, durante o *degorgement*.

A capacidade floculativa das leveduras é uma aptidão intrínseca das mesmas. As células possuem a aptidão de formar grumos compactos, o que no caso da produção de vinhos espumantes, facilita a formação de um depósito na garrafa, sendo mais fácil a sua remoção. Em estirpes de leveduras floculantes, as células separaram-se umas das outras depois da gemulação e posteriormente agregam-se, formando grandes flocos que sedimentam facilmente. A floculação é uma característica muito importante, especialmente na produção de vinhos espumantes pelo método tradicional. Flocos de levedura não causam turbidez aos vinhos e formam um depósito, que rapidamente se acumula no *bidule* facilitando assim o *degorgement* [58]. Coloretto *et al.*, 2006 conseguiram criar híbridos de leveduras floculantes *S.cerevisiae* e não floculantes, *Saccharomyces uvarum*. Estes híbridos apresentavam uma elevada capacidade de floculação e boa capacidade fermentativa, tanto a baixas como altas temperaturas. Estirpes com estas características seriam uma boa opção para serem aplicados na produção de vinhos espumantes pelo método tradicional de refermentação em garrafa, por terem a capacidade de formarem um depósito compacto e não causarem turbidez no vinho [45]. Futuramente, a modificação genética de leveduras poderá ser uma ferramenta poderosa a utilizar para melhorar o perfil de floculação ineficiente de algumas estirpes de leveduras de interesse para a enologia [45], [48].

#### **1.4.1.2- Linhagens com capacidade autolítica**

Durante o envelhecimento do vinho espumante, em contato com as borras, as leveduras sofrem autólise e são libertados vários compostos, que influenciam as características do vinho e a sua qualidade sensorial. Durante este processo, quando as leveduras se encontram em situações de escassez de nutrientes, ocorre a dissolução de organelos intracelulares levando à libertação de enzimas hidrolíticas do vacúolo para o citoplasma. Assim sendo, pela autofagia é possível acelerar a degradação enzimática dos organelos, provocando a libertação de compostos que têm uma grande influência sobre a qualidade dos vinhos espumantes. No entanto, a autofagia pode acelerar a morte celular, causando uma libertação mais rápida de compostos intracelulares de baixo peso molecular [59].

Dois fatores parecem ser os principais responsáveis pela lentidão de autólise: a baixa taxa de morte celular e a baixa velocidade das reações enzimáticas necessárias para concluir o processo, tanto devido à baixa taxa de envelhecimento como à baixa temperatura existente durante o processo. Existem dois métodos de momento disponíveis no momento para acelerar o processo autolítico durante produção de vinhos espumantes: a adição de autolisados de levedura no vinho e o aumento da temperatura do processo de envelhecimento.

Durante a fermentação secundária de vinhos espumantes, estirpes de *S. cerevisiae* mutantes autolíticas foram adicionados, mostrando-se capazes de acelerar o processo autolítico, enriquecendo assim os vinhos com componentes celulares. Com o objetivo de aumentar a libertação de polissacáridos da parede celular dessa estirpe, foi alterada a integridade da sua parede celular por mutagénesis UV [60]. A maioria das estirpes autolíticas são estirpes mutantes da *S.cerevisiae*, alteradas geneticamente por mutagénesis UV.

A investigação da seleção de linhagens de leveduras com uma maior capacidade autolítica ou com uma maior sobreexpressão dessas características pode contribuir para aumentar o amplo conjunto de leveduras selecionadas disponíveis para processos com dupla fermentação e ajudar a que este seja um processo mais célere [45].

#### 1.4.1.3- Linhagens sobreexpressoras de manoproteínas

As manoproteínas são um dos compostos, libertados pelas leveduras durante a autólise, mais abundante. São proteínas altamente glicosiladas, com mais de 90% de açúcares (essencialmente manose), localizadas no exterior da parede celular e representam 35-40% do seu peso seco. Desse modo, a investigação de estirpes que libertem grandes quantidades destes compostos é hoje em dia uma estratégia interessante para melhorar a qualidade do vinho espumante.

Com a finalidade de aumentar a quantidade de manoproteínas libertado durante a fermentação alcoólica, alguns autores têm desenvolvido estirpes mutantes termosensíveis e autolíticas e linhagens geneticamente modificadas de leveduras de *S. cerevisiae* [61]–[63]. A estirpe *S. cerevisiae* EC1118 é uma estirpe indicada para a segunda fermentação, amplamente utilizada e tem sido geneticamente modificada, de modo a produzir grande quantidade de manoproteínas [64].

Estudos recentes demonstraram que outras leveduras não *Saccharomyce*, encontradas na uva e no vinho, têm uma alta capacidade de libertar polissacarídeos (manoproteínas) importantes e que se encontram naturalmente no vinho. Tudo indica que estas leveduras promovem uma maior complexidade de aroma e uma melhor qualidade do vinho [62], [65]. Vários estudos indicam também que as estirpes sobreexpressoras de manoproteínas produzem vinhos com maior estabilidade quando comparadas com o vinho produzido por estirpes nativas [62], [63], [66].

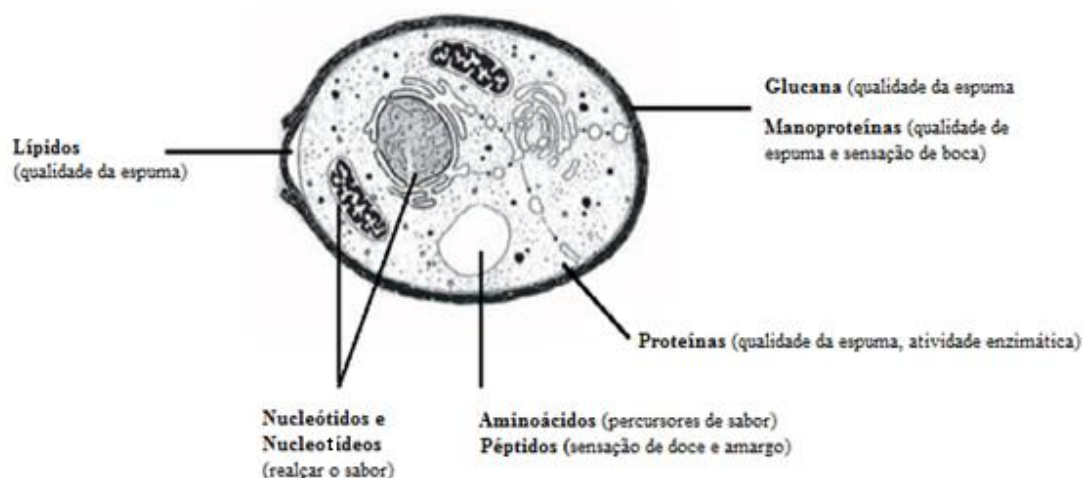
O uso de leveduras não *Saccharomyces* de vinho em associação com estirpes de *Saccharomyces* tem sido sugerida para aumentar também o conteúdo de glicerol, desacidificar o mosto, reduzir a concentração de ácido acético e elevar a acidez total do vinho [62], [67].

Um estudo, com o propósito de avaliar a capacidade de libertação de manoproteínas de diferentes leveduras, utilizou oito estirpes não *Saccharomyces*, previamente selecionados devido à sua capacidade de modular as concentrações finais de vários compostos voláteis e de permanecer viável em fermentações mistas com a *S.cerevisiae*. Estas estirpes eram pertencentes a: *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia fermentans*,

*Saccharomyces ludwigii*, *Starmerella bacillaris*, *Torulaspora delbrueckii* e *Zygosaccharomyces florentinus*. Todas estas demonstraram uma capacidade superior à da *S. cerevisiae* em libertar polissacarídeos. As proteínas libertadas pelas oito estirpes de leveduras mostraram uma grande variedade de tamanhos de proteínas, variando entre 25 kDa e 250 kDa. Para além disso foi determinada a abundância relativa das diferentes manoproteínas libertadas, mostrando que todas as estirpes apresentavam um perfil único de intensidade diferente para cada manoproteínas e um núcleo que varia de 8 a 15 resíduos de manose [62].

#### **1.4.2 - Preparados secos de leveduras inativas**

Nos últimos anos, pelo facto do envelhecimento sobre as borras ter demonstrado contribuir favoravelmente para a estabilidade e qualidade dos vinhos mas ter a tempo ser um processo lento, diminuindo a rentabilidade do processo, o uso de derivados de levedura na produção de vinho aumentou consideravelmente. São obtidas a partir de leveduras enológicas (*S. cerevisiae*) através de plasmólise autolítica ou processos de hidrólise e de seguida é concentrada ou seca, para ser incorporada em fórmulas comerciais. Dão origem a produtos diferentes, com funções e formulações diferenciadas, como por exemplo, as paredes celulares de levedura que atuam como agente de envelhecimento, realçador de sabor e estabilizadores de tartarato (Figura 7). A sua composição nem sempre é totalmente conhecida, e por vezes são compostos por uma mistura de produtos leveduras e enzimas [68].



**Figura 7** - Origem dos diferentes compostos liberados por leveduras durante a autólise[16].

As leveduras inativas são utilizadas para: servirem de nutrientes para as leveduras fermentativas, reagirem com taninos e reduzirem a sua adstringência (mais relevante em vinhos tintos), melhorando assim o aroma dos vinhos e evitar a oxidação prematura nos vinhos brancos [43]. Vasserot *et al.* (1997) mostrou que as antocianinas são adsorvidas pelas borras de leveduras inativas, através da criação de ligações covalentes, fracas e reversíveis, tendo duas fases distintas, sendo a segunda, uma fase de adsorção lenta e incompleta [69]. A capacidade das leveduras de consumir o oxigênio não é exclusivamente devido a células viáveis [70], [71]. Fornairon *et al.* (1999) verificou que os lípidos da membrana de borras de leveduras, em contato com oxigênio dissolvido, são capazes de se submeterem a uma oxidação, diminuindo assim a sua concentração no vinho, combatendo assim a oxidação dos mesmos.

Durante os processos de desidratação e reidratação as membranas de levedura são sujeitas a alterações bioquímicas e estruturais. As leveduras desidratadas podem sofrer danos nas membranas do citoplasma e no seu plasma. Estudos mostraram que a adição de leveduras inativas mortas a meios de reidratação de leveduras desidratadas foi muito eficiente para a conclusão das fermentações. As leveduras inativas mortas forneciam esteróis para a formação de micelas da membrana, constituídas por fosfolipídios e forneciam também polissacarídeos da parede celular para meio [43], [68], [72]. Estudos

realizados em vinhos sintéticos revelaram que a adição de 150 g. L<sup>-1</sup> de leveduras inativas durante a reidratação corresponderam à adição de 40 equivalentes de g. L<sup>-1</sup> de ergosterol para o meio de fermentação. No entanto, este efeito não foi comprovado em vinhos. Também tem sido sugerido que os PUFA (ácidos gordos polinsaturados), fornecidos pelas leveduras inativas, podem atuar como agentes de proteção reduzindo o choque osmótico, devido ao elevado teor de açúcar dos mostos, ajudando assim as leveduras a adaptarem o seu metabolismo a novas condições. Assim, este efeito pode reduzir o *stress* da levedura, diminuir a acidez volátil e a ocorrência de alguns *off-flavors* no vinho (como o caso do sulfeto de hidrogênio, produto secundário da fermentação alcoólica, intimamente associado à capacidade intrínseca das leveduras utilizada de o produzir [73]). Foi também sugerido que os esteróis e os PUFAs, libertados durante a reidratação, podem atuar como reservatórios de micronutrientes, podendo ser transferidos para as novas gerações de levedura, aumentando assim a resistência e a viabilidade da população final de levedura. Embora esta seja uma reivindicação comum em preparações comerciais de leveduras inativas, este efeito permanece até agora por comprovar [68].

As leveduras fermentativas responsáveis pela vinificação têm certas necessidades nutricionais dependentes de fontes de nitrogênio. As espécies de *Saccharomyces* podem utilizar o íon amônia (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e os ácidos  $\alpha$ -amina livres como fonte de azoto. A partir da amônia, a levedura é capaz de sintetizar todos os compostos azotados de que necessita, incluindo aminoácidos. No entanto, se esta estiver esgotada, as leveduras também podem utilizar aminoácidos de forma eficiente. Os baixos níveis de compostos nitrogenados assimiláveis pelas leveduras ( $\alpha$ -aminoácidos e amônia) têm sido relacionados a menores taxas de fermentação e a cinética de fermentação mais longas, sendo estes os dois fatores apontados como principais responsáveis pelas fermentações lentas. Além disso, o etanol e outros produtos de metabolismo da levedura durante a fermentação, tal como os ácidos gordos de cadeia média, podem contribuir para estes fenómenos. Para evitar esses problemas, vários tipos de fontes de nutrientes inorgânicos, que incluem principalmente os sais de amônia e de tiamina têm sido empregues [74]. Os fabricantes de leveduras começaram recentemente a recomendar o uso de promotores de fermentação baseado em componentes de levedura. Dependendo da sua composição, os preparativos potenciadores da fermentação podem comportar-se de forma diferente. A maior parte deles pode incluir uma fração solúvel, na maior parte formada pelos metabolitos do citoplasma da levedura

(proteínas, péptidos, polissacarídeos, aminoácido, esteróis e ácidos gordos) e uma fração insolúvel de suporte inerte inativo, normalmente de celulose, devido à sua relativa capacidade adsortiva de compostos tartáricos. Vitaminas e minerais também são frequentemente incluídos na maioria das preparações de extratos secos de leveduras inativas [68].

Feuillat e Guerreau (1996) estudaram o efeito de quatro preparações de leveduras inativas de diferentes composições, vulgarmente utilizadas como potenciadoras de fermentação, em meios sintéticos. Todos eles (na dose de 500 mg. L<sup>-1</sup>) mostraram uma melhoria na fermentação alcoólica (consumo mais rápido açúcar e maior número de leveduras viáveis) em comparação com o controlo (sem ativador de fermentação), no entanto, os seus mecanismos de ação eram diferentes, dependendo da composição em nutrientes de cada vinho. A fração solúvel das leveduras inativas suplementou o meio em azoto assimilável (aminoácidos, sais de amónia). Para meios enriquecidos em azoto, esse benefício parece não ser muito importante, no entanto, a fração insolúvel das leveduras inativas conduz a um melhoramento da fermentação em meios enriquecidos com azoto devido à possível ação que as paredes de levedura podem ter sobre os compostos tóxicos (etanol, ácidos gordos de cadeia média) [68]. Certos compostos são tóxicos pois inibem ou diminuem a capacidade metabólica da levedura. A presença de elevadas concentrações de etanol inibe a conversão da sacarose, tornando a fermentação lenta. Já os ácidos gordos de cadeia média diminuem a viabilidade da levedura já que apresentam um efeito inibitório no transporte da sacarose [7]. Lafon-Lafourcade *et al* (1984) foram os primeiros a demonstrar a capacidade das paredes de levedura de se ligarem a compostos tóxicos. As leveduras e os preparados de leveduras secas são capazes de adsorver muitos compostos. As manoproteínas, localizadas na camada externa da parede da célula de levedura, são responsáveis por esta propriedade. Nas leveduras do género *Saccharomyces* as glucanas das manoproteínas contêm oligossacáridos neutros, essencialmente compostos por manose e *N*-acetilglucosamina, mas também oligossacáridos acídicos com fosfato de manosilo. Na gama de pH do vinho, as manoproteínas apresentam cargas negativas, que podem estabelecer interações eletrostáticas e iónicas com os outros compostos do vinho [43], [75].

Para além das paredes das leveduras, todo o conteúdo das mesmas, presente em preparados comerciais de leveduras inativas, utilizados como potenciadores de fermentação, também

apresentam função de desintoxicação, uma vez que foi mostrado que o conteúdo citoplasmático é incapaz de ser libertado para o meio, devido à inativação das enzimas responsáveis pela autólise durante a produção dos preparados de leveduras. Um outro estudo mostrou que a fonte de azoto tem uma grande importância na composição de ácidos gordos da membrana de *S. cerevisiae* e, por conseguinte, sobre o processo de fermentação. Os autores constataram que sob condições de elevada concentração de açúcar no mosto, a utilização de uma maior quantidade de azoto assimilável (tanto em amónia como aminoácidos de preparados de leveduras inativas) não conduziu a uma melhor fermentação, mas produziu um maior atraso na velocidade de crescimento celular comparativamente a meios com apenas uma única fonte de amónia [68], [76], [77].

Elevados níveis de esteróis presentes em algumas preparações de leveduras inativas são mais um dos motivos sugeridos para a sua utilização destas preparações como potenciadores de fermentação. Estudos mostraram que o aumento do teor de esteróis no mosto promoveu uma fermentação mais ativa devido ao aumento da permeabilidade da membrana, levando a uma troca mais elevada de substâncias entre a célula e o meio [78]. Além disso, sugeriram que os esteróis poderiam agir como um fator de sobrevivência, devido ao aumento das reservas que a levedura tem disponível para poder usar durante a fase de declínio. Mais recentemente, González-Marco *et al.* (2006) mostraram que os mostos de uva Chardonnay, suplementados com autolisado de levedura inativas, as leveduras fermentativas consumiram uma maior quantidade de azoto livre durante a segunda metade da fermentação alcoólica em comparação com um mosto de controlo (sem adição). Os autores sugeriram que os autolisados de levedura enriqueciam os mostos em ácidos gordos de cadeia longa (C16, C18), minimizando assim os danos na membrana da levedura, permitindo-lhe manter o transporte da membrana, que de outro modo poderia ser comprometida pelo elevado nível de etanol do meio.

A cor é uma das características mais importantes no vinho. Com o objetivo de melhorar a cor e aroma dos vinhos brancos, os preparados de leveduras inativas são especialmente formulados para reduzir o fenómeno de oxidação nos mesmos. Pensa-se que essa ação é devido a um tripéptido (*L*-glutamato, *L*-cisteína e glicina), intracelular de origem não proteica, a glutathione, presente em concentrações mais elevadas nestas preparações. A glutathione é naturalmente presente nas uvas e mostos (56,3-371,8 mM nas



uvas e 41,9-332,7 mM em mostos). É sintetizada no citoplasma e cloroplastos de células vegetais (uvas), em duas reações sequenciais dependentes de ATP. A  $\gamma$ -glutamilcisteína é sintetizada pelo *L*-glutamato e a *L*-cisteína pela  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase. A glutathione sintetase cataliza a adição de glicina para formar a glutathione [79]. Nos vinhos, a concentração é entre 0,1 e 5,1 mg. L<sup>-1</sup>. A sua evolução durante a produção do vinho e a sua função exata na produção destes é ainda pouco conhecida [68]. A elevada concentração de glutathione em células de levedura (até 10 mM) e seu baixo potencial redox faz com que este tripéptido atue como um tampão celular redox. Nas *S. cerevisiae*, este composto está implicado em muitas respostas a mecanismos de *stress* (privação de enxofre e nitrogênio, *stress* oxidativo, desintoxicação de xenobióticos) e podem também desempenhar um papel na manutenção de funções básicas de integridade estrutural celular [68]. A adição de glutathione em vinho tem sido recomendada para prevenir o escurecimento enzimático de vinhos brancos. Tem sido demonstrado que a adição 10 mg. L<sup>-1</sup> de glutathione antes do engarrafamento do vinho pode reduzir os fenômenos de oxidação do vinho, preservando a cor do vinho e alguns compostos de aroma varietal e reduzindo a ocorrência de compostos de aroma oxidados. Apesar de tudo, a eficácia do uso de preparados de leveduras inativas para preservar os vinhos da oxidação ainda não tem evidências comprovadas. A quantidade de glutathione libertada por estes preparados e a sua influência no vinho permanecem desconhecidas [68]. Lavigne *et al* (2007) mostraram que a quantidade de glutathione presente num vinho no final da fermentação alcoólica depende da estirpe de levedura, tendo verificado variações entre 30-50  $\mu$ mol. L<sup>-1</sup>, no final de fermentação e 40-80  $\mu$ mol. L<sup>-1</sup> após 3 meses.

A utilização de preparações de leveduras inativas para a melhoria das características sensoriais do vinho é uma das possíveis aplicações que tem suscitado maior interesse entre os produtores de vinho. Os mecanismos de ação responsáveis por essas melhorias ainda não são bem compreendidos.

A capacidade de absorção de moléculas odorantes é outra das possibilidades de ação dos preparados de leveduras inativos. Foi demonstrado que estes preparados têm a capacidade de remover alguns compostos capazes de inibir a fermentação alcoólica, como ácidos gordos de cadeia curta (C:6-C:11), que também têm uma grande influência no aroma do vinho. Alguns estudos recentes demonstraram que as manoproteínas destes

preparados são capazes de reter compostos de aroma. As duas partes da molécula (glicosídica e peptídica) estão envolvidas na interação com as moléculas de aroma e o efeito foi dependente do tipo e estrutura das manoproteínas (85-90% de hidratos de carbono e 10% de proteína) e da estirpe de levedura, assim como das características do composto volátil, que confere o aroma, peso molecular, constituição dos grupos químicos, polaridade e volatilidade relativa [80], [81]. Em suma, a sorção dos compostos voláteis às macromoléculas depende da capacidade destes compostos formarem ligações de hidrogénio ou interações hidrofóbicas [81]. Rocha *et al* (2007) mostraram, para vinhos sintéticos, que o nível de retenção dos compostos voláteis testados (ésteres de etilo) é mais forte para compostos mais voláteis. Os mesmos autores sugerem também que em vinhos reais, os compostos hidrofóbicos podem ser retidos pelo material polimérico e libertados lentamente para o *headspace* da garrafa, quando esta é aberta, contribuindo assim para a percepção dos aromas, por parte dos consumidores, durante um maior período de tempo.

Recentemente os preparados de leveduras inativas começaram a ser utilizados para remoção de toxinas e metais pesados perigosos que possam estar presentes no vinho, devido às suas capacidades adsorptivas. A ocratoxina é uma micotoxina nefrotóxica e cancerígena conhecida, produzida por *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* O vinho é um dos muitos produtos alimentares que podem ser contaminados com ocratoxina. A União Europeia (Regulamento da UE 1881/2006, 19 dezembro de 2006), estabeleceu um limite máximo de 2  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de ocratoxina. Por esta razão, existe um grande interesse na procura de estratégias para reduzir ou eliminar este composto dos vinhos. Autores mostraram que apenas 20 g.  $\text{L}^{-1}$  de borras de levedura (formadas principalmente por paredes de levedura) foram capazes de reduzir em até 70% o teor de ocratoxina em vinhos após 7 dias. A existência de fenómenos de competição pelo local de ligação, na superfície da célula de levedura, por parte dos polifenóis do vinho e a ocratoxina, conduzem à elevada eficácia da redução dos níveis da toxina [68].

Outras substâncias tóxicas para além das toxinas, tais como metais pesados (chumbo, cádmio) também podem estar presentes em vinhos. A Organização Internacional da Vinha e do Vinho definiu concentrações máximas de chumbo e cádmio em vinho de 150 e 10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respetivamente. As concentrações destes metais podem ser reduzidas nos vinhos através da adição de quitina de origem fúngica. [38]. Além disso, quantidades excessivas de ferro, ( $\geq 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) podem causar problemas de estabilização nos vinhos,

pois este composto é solubilizado por ácidos provocando assim a turbidez no vinho, muito associada à presença de iões metálicos [38]. Assim, o uso de preparados de leveduras inativas pode ser uma alternativa a controlar estes problemas [68].

Os preparados secos de leveduras inativas que são utilizados para a adsorção de toxinas, ácidos gordo de cadeia curta e metais podem no futuro ser alargado a outras aplicações para melhorar a segurança de vinhos. Alguns dos exemplos de possíveis aplicações são: redução aminas biogénicas e remoção de pesticidas de vinhos.

### **1.4.3 - Leveduras imobilizadas**

A utilização de leveduras imobilizadas para a fermentação em garrafa de vinhos espumantes tem sido amplamente aplicada. No processo tradicional, a remoção das borras é um processo demorado, com elevada necessidade de mão de obra. A utilização de leveduras imobilizadas permite simplificar o processo da remoagem e do *degorgement*. Para além disso têm a vantagem de suportarem melhor a fermentação, pois estão parcialmente protegidas contra a toxicidade do etanol [82].

A utilização de leveduras imobilizadas na segunda fermentação de vinhos espumantes consiste na introdução de uma certa quantidade de esferas, contendo células de levedura, na garrafa. Durante o crescimento das células, estas permanecem presas nas esferas e a clareza vinho é preservada [83].

As leveduras imobilizadas possuem os requisitos necessários para serem aplicadas na indústria do vinho. Apresentam uma adequada pureza alimentar, de natureza não degradável e estão aptas para fermentações a baixas temperatura. Existem várias possibilidades de imobilização de leveduras, no entanto, a oclusão em géis de polissacarídeos, tais como ágar-ágar, alginato e carragenana são os mais amplamente utilizados [57], [84]. Yokotsuka *et al* (1997) produziram leveduras imobilizadas em bicamada de esferas de gel de cálcio e alginato obtendo vinhos espumantes semelhantes, em sabor e *bouquet*, a vinhos produzidos utilizando leveduras livres [84].

Bozdogan *et al* (2008) demonstraram que o uso de leveduras imobilizadas não alterava significativamente a composição de aminoácidos livres e de péptidos, quando comparado com o uso de leveduras livres dos vinhos espumantes.

### 1.4.4 - Preparados enzimáticos

As enzimas apresentam diferentes atividades enzimáticas, tendo por isso diferentes aplicações: as pectinases (extração e clarificação); glicosidades (libertação de aromas); glucanases (clarificação); proteases (redução da turbidez); urease (degradação de ureia para controlo da quantidade carbamato de etileno); lisozima (preservação microbiana) [85], [86]. Os preparados enzimáticos são usados em várias etapas do processo de vinificação, sendo aplicadas nas uvas, mosto e no vinho, após a fermentação alcoólica. Elas são aplicadas sobretudo para auxiliarem nos seguintes processos: extração, clarificação, filtração e maturação, quer para a libertação de aromas, quer envelhecimento *sur lies* [85].

As uvas e as leveduras são as duas principais fontes de enzimas da vinificação. No entanto, as condições típicas, como as elevadas concentrações de açúcares, etanol e elevada acidez encontradas durante os processos de vinificação, inibem a ação das enzimas, fazendo com que muitas reações não sejam completas e parte do substrato fica por consumir. Várias das reações enzimáticas são benéficas para as características e qualidades do vinho, desse modo, a utilização de preparações enzimáticas exógenas, que apresentam uma maior eficácia, sob as condições de vinificação começaram a ser introduzidas, de modo a mais facilmente se obter um nível de transformação de substrato desejado.

Na produção de vinhos espumantes, o envelhecimento *sur lies* é o passo que mais contribui para as características finais do mesmo, essencialmente ao nível do aroma e da espuma formada. Esse envelhecimento, apesar de bastante vantajoso, é um processo demorado. Após a fermentação terminar, as leveduras vão entrando em morte celular, por autólise, através de uma autodestruição enzimática. Ultimamente, grande parte da produção de vinho espumante utiliza leveduras imobilizadas, por ser um método mais rápido e fácil. A utilização de preparados enzimáticos conjuntamente com o uso de

preparados enológicos de leveduras parece ser uma solução rápida e eficaz para uma produção de vinhos espumantes.

A maior parte dos preparados enzimáticos são constituídos por uma mistura de enzimas, por norma incluem  $\beta$ -glucanases e pectinases, e que aumentam consideravelmente a composição de polissacarídeos nos vinhos onde estes preparados são usados [45].

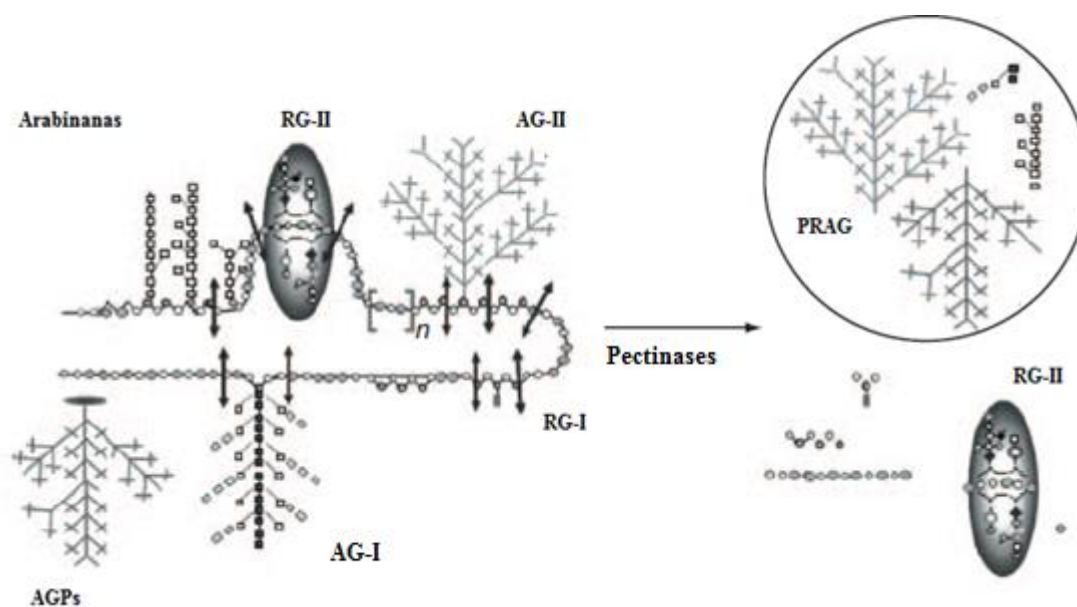
### 1.4.4.1- Pectinases

Existem diferentes pectinases e cada uma apresenta um papel específico na hidrólise das moléculas de pectina (Figura 8). Os preparados comerciais apresentam uma mistura destas enzimas. São obtidas através do cultivo de leveduras *Aspergillus sp.* A maioria das enzimas pertencentes a este grupo, e mais estudadas, são as poligalacturonases (degradam a cadeia principal do ácido poligalacturónico da pectina a oligómeros ou monómeros de ácido galacturónico), pectinesterases (catalisam a desesterificação dos resíduos do ácido galacturónico, libertando metanol ou ácido acético), pectinaliases (catalisam a quebra da cadeia principal da pectina, produzindo um produto insaturado de ácido galacturónico). As arabinases, ramnogalacturonases e galactanases também podem ser encontradas nos preparados comerciais. Muitas das enzimas presentes nos preparados são isoenzimas, que conseguem atuar em diferentes valores de pH, temperatura ótima e graus de esterificação da pectina. A existência dessas isoenzimas explica o motivo desses preparados não apresentar sempre o mesmo resultados [45], [85], [87].

O uso de pectinases nas uvas permite reduzir a viscosidade do mosto obtido para além de favorecer a libertação do sumo delas mesmo a baixas pressões de maceração. Estas enzimas hidrolisam a parede celulósica das células, aumentando assim o rendimento de sumo obtido mesmo sofrendo prensagens abaixo de 1 bar [85]. Ensaio em escala piloto mostraram que o uso de enzimas pectinases nas uvas ( $3\text{g. kg}^{-1}$ ) aumentou o rendimento do mosto obtido em 22% [85]. Na vinificação de vinho branco ou rosé a partir de uvas tintas, as pectinases mostram-se bastante vantajosas pois ajudam a alcançar tempos de prensagem

mais curtos e permitem realiza-las em condições mais suaves, produzindo assim mostos de maior qualidade.

A fração de polissacarídeos do vinho inclui polissacarídeos ricos em arabinose e galactose (maioritariamente arabinogalactanas do tipo II), arabinanas e ramnogalacturoranas provenientes das paredes celulares das uvas [88]. Provenientes da fermentação e da maturação em contato com as leveduras, os oligossacarídeos e as manoproteínas são os polissacarídeos principais presentes no vinho [89]. Ducasse (2009) demonstrou que as pectinases usadas para a extração de uvas tintas provocaram uma alteração do perfil da distribuição do peso molecular dos polissacarídeos habitualmente encontrados nos vinhos [90], [91].



**Figura 8** - Substrato de pectina e a ação da pectinase sobre este. AG (arabinogalactana), AGP (arabinogalactana proteína), RG (ramnogalacturonana), PRAG (polissacarídeos ricos em arabinose e galactose) [88]

#### 1.4.4.2- Glucanases

As  $\beta$ —glucanases (endo e exoglucanases) são capazes de hidrolisar a ligação  $\beta$ -O-glicosídica das cadeias de  $\beta$ -glucana, levando assim à libertação de glucose oligossacarídeos e manoproteínas ligadas à parede celular ou covalentemente ligadas às  $\beta$ —glucanas. Durante a autólise, a parede celular é gradualmente degradada devido à quebra de glucana e quitina causados por enzimas endógenas incluindo glucanases (que estão presentes nas paredes das células até 4 meses após a morte dos leveduras) e manosíases [46]. As preparações comerciais de  $\beta$ -glucanases autorizadas para vinificação são sintetizadas por espécies de *Trichoderma*. A atividade enzimática destas enzimas leva à degradação das glucanas, resultando numa libertação de manoproteínas ligadas às glucanas. Devido à existência de glucanases solubilizadas no meio, as glucanas são libertadas. [45], [92].

A adição exógena de  $\beta$ -1,3 -glucanases em vinhos que se encontram em contato com leveduras pode promover a libertação de manoproteínas das mesmas, a partir da parede celular, pois estas encontram-se covalentemente ligadas. Palomero *et al* (2007), estudaram o efeito da adição exógena de  $\beta$ -1,3-glucanases, durante o envelhecimento do vinho. O preparado enzimática Lallzyme MMX<sup>®</sup> (Lallemmand) acelerou o processo de autólise, facilitando deste modo a libertação de fragmentos de polissacarídeos, de tamanho uniforme e menores que os obtidos pela forma convencional de envelhecimento do vinho *sur lies*. Verificaram também que a adição exógena de  $\beta$ -1,3-glucanases reduz o tempo necessário para que ocorresse autólise aumentando a liberação de polissacarídeos das paredes celulares e compostos intracelulares que têm um efeito positivo sobre qualidade do vinho e da sua espuma [46].





## **2 - Contextualização do** **trabalho**



## **2 – Contextualização do trabalho**

### **2.1 - Aliança Vinhos de Portugal S.A.**

Fundada em 1927, em Sangalhos (Anadia), a Aliança Vinhos de Portugal S.A. conta já com 88 anos de existência, e desde o seu começo a exportação foi um dos pontos fortes desta empresa, enviando os seus produtos para o Brasil, África e Europa. Hoje, mais de 50% da sua produção destina-se à exportação, sobretudo de vinhos espumantes e aguardentes, imagem de marca da Aliança em Portugal e nos cerca de 60 países para onde exporta.

Em 2007, a Bacalhôa Vinhos de Portugal adquiriu o capital maioritário da Aliança, passando esta a pertencer ao Grupo Bacalhôa, tendo sido a designação social das Caves Aliança S.A. alterada para Aliança Vinhos de Portugal S.A..

A grande missão desta empresa assenta sobre gerar valor para os acionistas, colaboradores e sociedade em geral, através da conceção e desenvolvimento, produção e comercialização de vinhos espumantes e aguardentes de excelência, adequados às necessidades e expectativas dos clientes e consumidores a nível nacional e internacional.

### **2.2 - Proenol - Indústria Biotecnológica, Lda**

A Proenol- Indústria Biotecnológica, Lda é uma PME que em agosto de 2000 iniciou os estudos no processo de encapsulamento de leveduras para aplicação vinícola. É uma empresa de inovação que pretende colocar a biotecnologia ao serviço da enologia de uma forma natural e eficaz, através da investigação no sector vitivinícola, recorrendo aos recursos da Natureza de forma a encontrar soluções que otimizem a produção de vinho para o prazer do consumidor. É uma empresa que tem desenvolvido parcerias que proporcionam alianças de conhecimento a nível mundial, garantindo a qualidade e competitividade pela postura inovadora, pioneira e de parceria com quem atua.

Os objetivos base desta empresa são vários: contribuir para o crescimento da comunidade científica, com vista a potenciar o desenvolvimento de práticas enológicas; inovar e fomentar a criação de um vinho diferente, com qualidade e que

respeita a tradição do mundo vitivinícola fazendo o incentivo do seu crescimento através da aliança entre a ciência e Natureza; liderar o mercado pela inovação, entendimento da enologia, comercialização de auxiliares tecnológicos e da notoriedade da marca; consolidar a evolução dos objetivos primários até então alcançados, tais como: a participação no mercado, o crescimento e a lucratividade.

É uma empresa que perante o inconformismo das soluções existentes, investiga novas respostas biotecnológicas para as barreiras que se vão encontrando na enologia, atuando com imparcialidade, segundo as bases e rigor do conhecimento científico.

### **2.3 - Vinhos espumantes**

Os vinhos espumantes continuam a ser um dos vinhos de excelência e que continuam a ter a procura crescente do consumidor. É um vinho que devido às suas características de processo é um pouco acima do preço de um vinho normal, principalmente devido ao tempo de produção que exige para que se obtenha as características desejadas e apreciadas.

A segunda fermentação dos espumantes é sem dúvida uma das etapas mais crítica, sensível e demorada do processo. É sabido que muitos dos processos que envolvem o envelhecimento *sur lies* podem melhorar algumas das propriedades organoléticas do vinho, sendo a qualidade da espuma uma das propriedades mais apreciadas. Os compostos libertados durante a autólise de leveduras, especificamente péptidos, aminoácidos, esteróis e polissacarídeos (manoproteínas), parecem ser os principais responsáveis pelo melhoramento dessas propriedades. No entanto este é um processo complexo e lento, que pode levar anos até ser concluído. Por esta razão, a utilização de preparações de leveduras inativas comerciais, que incluem na sua composição os produtos libertados durante a autólise da levedura podem ser uma forma de contornar essas desvantagens, podendo encurtar o tempo de produção, sem perda de qualidade do produto e com características semelhantes, ou melhores, que o produto produzido pelo método tradicional.

A parceria entre as duas empresas acima mencionadas pode ser vantajosa na procura de uma solução para um processo de produção de vinho espumante mais eficaz. A

união dos conhecimentos e experiência na produção enológica por parte da empresa Aliança Vinhos de Portugal S.A. com as inovações e soluções biotecnológicas, por parte da Proenol Indústria Biotecnológica, Lda permitiu a criação de um projeto de interesse para estas duas empresas.

Devido à situação económica, à competitividade e concorrência existentes e ao aumento do grau de exigência dos consumidores e do mercado, a produção de vinhos espumantes com qualidade e diferenciados pode ser um trunfo e uma mais-valia.

### **2.4 - Objetivos do trabalho**

O primeiro objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da primeira fermentação na espumabilidade e estabilidade de três vinhos base obtidos do mesmo mosto, sendo cada um obtido a partir de três fermentações diferentes 1) fermentação com *S. cerevisiae* Affinity® ECA5 (método típico da empresa Aliança Vinhos de Portugal S.A.); 2) fermentação com Affinity® ECA5 e aplicação do produto enológico Optimum White®, derivado de uma levedura enológica inativa; 3) fermentação sequencial do mosto, tendo sido inicialmente inoculado com *T. delvryeckii*, Biodiva™ TD291, seguindo-se da levedura *S.cerevisiae*, Affinity® ECA5.

O segundo objetivo foi avaliar o efeito da adição de dois produtos enológicos derivados de leveduras secas inativas na segunda fermentação. Estes produtos enológicos foram adicionados com o licor de tiragem aos vinhos base. Por cada vinho base foram produzindo três tipos diferentes de vinho espumantes, um sem a adição de qualquer produto enológico, um com o produto Optimum White® e o terceiro com OptiRED®.

No sentido de compreender a influência do material polissacarídeo com a quantidade e estabilidade de espuma formados, o terceiro objetivo deste trabalho centrou-se no isolamento e caracterização da composição de polissacarídeos dos produtos enológicos utilizados e dos vinhos base e espumante com a espumabilidade e estabilidade da espuma.



## **3 - Metodologias**





### 3 - Metodologias

#### 3.1 - Vinificação

Todo o vinho utilizado neste trabalho experimental foi obtido da vinificação típica de vinhos espumantes brancos a partir de uvas da casta tinta Castelão, provenientes da Quinta dos Lorigos, concelho de Bombarral, pertencente à zona vitivinícola da região de Lisboa.

As uvas deram entrada na adega em caixas de plástico no dia 2 de setembro de 2014, previamente tinha-se procedido à avaliação do estado de maturação. Para a vinificação do vinho base utilizaram-se cerca de 15.000 kg de uvas.

As uvas foram desengaçadas, prensadas (prensa pneumática vertical) e no mosto efetuou-se a aplicação de  $\text{SO}_2$  a  $40 \text{ mg. L}^{-1}$  para a prevenção de processos de oxidação e da degradação microbiana do vinho. Da prensagem do mosto apenas o mosto resultante da prensagem de 0,2 bar foi utilizado para a produção de vinho base. De seguida o mosto foi arrefecido para cerca de  $18^\circ\text{C}$ , fazendo-o passar por um permutador de calor. Foi aplicado polivinilpolipirrolidona (PVPP) na dose de  $20 \text{ g. hL}^{-1}$ , responsável pela diminuição da densidade óptica dos vinhos devido à diminuição das catequinas e leucoantocianinas responsáveis pelo acastanhamento. Foi também aplicado carvão ativado na dose  $1,5 \text{ g. L}^{-1}$ , responsável pela descoloração de mostos e vinhos brancos através da eliminação dos compostos fenólicos oxidados responsáveis pelo acastanhamento e eliminação de possíveis antocianinas, que possam ter migrado das películas das uvas tintas que foram utilizadas. Aplicaram-se enzimas de clarificação (Lallzym Process Color® e Novoclar® Speed) nas doses de  $2 \text{ g. L}^{-1}$  e  $1 \text{ g. L}^{-1}$ , respetivamente. Estas enzimas contêm pectinases que contribuem para a redução da viscosidade do mosto, facilitando o processo de filtração. Após aplicação das enzimas o pH foi acertado para 3,2 com ácido tartárico.

O mosto resultante foi decantado e transferido para uma cuba de 30.000 L. Seguidamente adicionou-se azoto orgânico proveniente de fragmentos de leveduras (Fermaid O®) na dose de  $20 \text{ g. hL}^{-1}$ , para garantir as necessidades de azoto e fosfato necessário para o metabolismo eficaz das leveduras durante a fermentação alcoólica. Fez-se nova decantação e transferiu-se o mosto para 3 cubas de 10.000 L. Assim, em cada uma

das cubas deu-se uma primeira fermentação e obtenção de um vinho base diferente. Na primeira cuba (Aff) foi realizada uma fermentação controlo, apenas com a adição de leveduras livres de *S. cerevisiae* (Affinity® ECA5), na dose de 20 g. hL<sup>-1</sup>. Na segunda cuba (AffOW) houve a inoculação da mesma levedura livre, na mesma dose, em conjunto com a adição de um produto enológico, o Optimum White® (Anexo I), na dose de 30 g.hL<sup>-1</sup>. Na terceira cuba (AffBd) foi inoculada a levedura *T. delbrueckii* (Biodiva™ TD291 (Anexo II)), na concentração de 25 g. hL<sup>-1</sup> e após o abaixamento de 15 g. cm<sup>-3</sup> na massa volúmica do mosto foi inoculada a levedura *S. cerevisiae* (Affinity® ECA5), na mesma concentração descrita.

As fermentações ocorreram a cerca de 16° C. A densidade do mosto e a temperatura foram analisadas diariamente de forma a controlar a evolução da fermentação alcoólica dos ensaios. Quando a densidade atingiu os 1,060 g. L<sup>-1</sup> houve a aplicação de FERMAID E®, que contém células de leveduras inativas, fosfato e sulfato de diamónio, gel de sílica e tiamina, suplementando assim as leveduras azoto assimilável e em factores de crescimento (esteróis, ácidos gordos de cadeia longa). À densidade de 1,000 g. L<sup>-1</sup> foi adicionado um agente redutor de aromas enxofrados, à base de cobre imobilizado (REDULESS®). Quando a densidade foi inferior a 1,000 g. L<sup>-1</sup>, mantendo-se constante durante 3 dias seguidos, a fermentação alcoólica foi considerada finalizada e o mosto passou a ser denominado de vinho base.

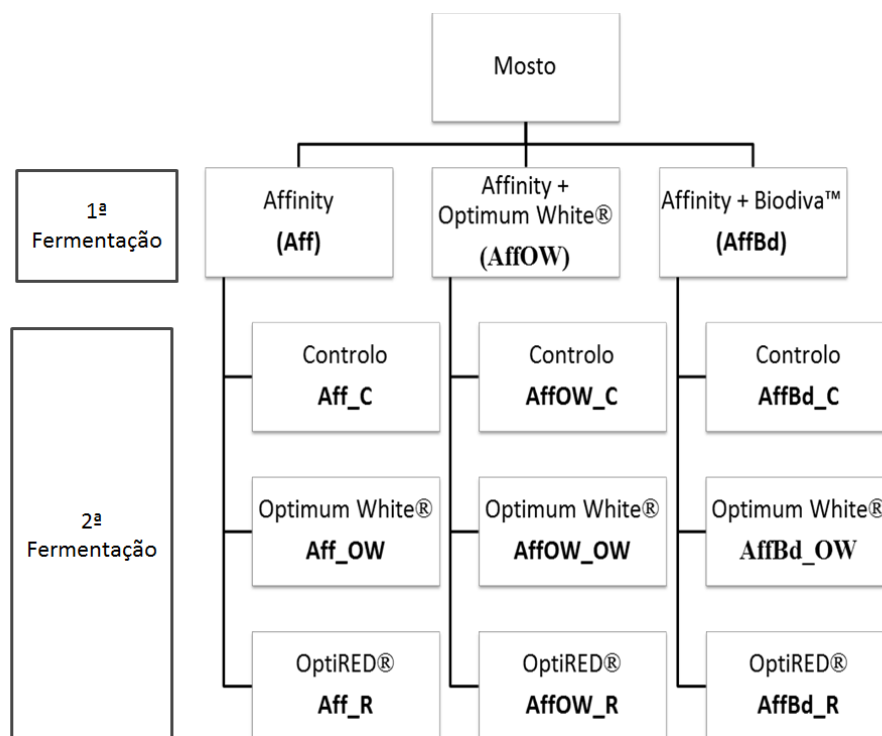
Após a fermentação terminar houve a aplicação de SO<sub>2</sub> na dosagem de 15 mg. L<sup>-1</sup>, e os vinhos ficaram em repouso durante dois meses. Findo esse tempo, realizou-se a filtração tangencial, seguida do processo de eletrodialise, no dia 24 de novembro de 2015. Após esses processos houve a realização de análises físico-químicas, para verificar, se o vinho base obtido já tinha atingido os parâmetros necessários para seguir para o processo para a espumatização (SO<sub>2</sub> livre <15 mg. L<sup>-1</sup>; pH ≥ 3,0; teor alcoólico ≤ 11,5% (v. v<sup>-1</sup>); azoto assimilável ≥ 100 mg. L<sup>-1</sup>; estabilidade proteica e tartárica). Foram preparados os concentrados dos dois preparados de leveduras inativas utilizados, sendo o volume final de cada preparado obtido de 1L. A preparação das soluções iniciou-se com a dissolução de cada preparado de leveduras secas em vinho, agitando bem. O vinho utilizado para a dissolução foi o vinho base controlo obtido durante a primeira fermentação (Aff). O pH foi ajustado, com ácido sulfúrico, para o valor de 2,8 (± 0,1) e de seguida adicionado um preparado enzimático comercial (Lallzyme MMX® (Anexo III), na concentração de 20 g.

$\text{hL}^{-1}$ . A agitação das soluções foi realizada manualmente, duas vezes por dia, por cerca de trinta minutos, durante cinco dias. Na mesma data, foram retirados 120 L, de cada uma das cubas com as diferentes variedade de vinho base, distribuídos por contentores de 20 L, para se realizarem 3 ensaios diferentes, para produção de vinhos espumante pelo método tradicional:

1. A 40 L de vinho de cada uma das cubas, a segunda fermentação prosseguiu segundo o processo já implementado pela empresa Aliança Vinhos de Portugal, S.A., representando este o vinho controlo.
2. A 40 L de vinho de cada uma das cubas, foi-lhe adicionado uma solução de Optimum White<sup>®</sup>, na concentração final de  $40 \text{ g. hL}^{-1}$ .
3. A 40 L de vinho de cada uma das cubas, foi-lhe adicionado um outro produto enológico, o OptiRED<sup>®</sup> (Anexo IV), na concentração final de  $40 \text{ g. hL}^{-1}$ .

Após um dia da data de adição dos produtos enológicos, foi adicionado o licor de tiragem, composto por sacarose ( $26 \text{ g. L}^{-1}$ , fosfato de diamónio ( $0,2 \text{ g. L}^{-1}$ ) e tiamina ( $0,3 \text{ mg. L}^{-1}$ ). Passado mais um dia, filtrou-se novamente o vinho por um sistema de sequencial de filtros de membrana de  $1,0 \mu\text{m}$  e  $0,45 \mu\text{m}$  e procedeu-se ao engarrafamento do mesmo. Foram utilizadas de leveduras imobilizadas em esferas de alginato, as ProElif. Assim, as garrafas previamente preparadas continham uma dose de esferas de 1,2 a 1,3 g por garrafa, o equivalente a 4,8 a 6 milhões de células viáveis.  $\text{mL}^{-1}$  de vinho. De cada uma das nove variáveis de vinho realizados foram obtidas cerca de 40 garrafas. Um esquema geral do processo de vinificação com os respetivos ensaios realizados é apresentado na Figura 9. Após o engarrafamento dos vinhos, estes permaneceram em repouso, sob temperaturas de  $13\text{-}14^{\circ}\text{C}$ .

Devido ao número restrito de manómetros disponíveis, estes foram colocados nas variedades de vinho com adição de Optimum White<sup>®</sup>, durante a segunda fermentação (após tiragem), para avaliação contínua da evolução da segunda fermentação, avaliando a pressão de formação de  $\text{CO}_2$  ( $P_{\text{CO}_2}$ ), sendo os valores registados, de 2 em 2 dias, até a fermentação terminar. De dez em dez dias, uma garrafa de cada uma das nove variedades produzidas foi submetida a uma avaliação do valor de  $P_{\text{CO}_2}$ . Desse modo a evolução da fermentação de todos os vinhos foi controlada.



**Figura 9** - Esquema geral do processo de vinificação realizado.

### 3.2 - Análises físico-químicas

#### 3.2.1 - Determinação da massa volúmica a 20 °C ( $\rho_{20}$ ) de mostos

Segundo o OIV (The International Organisation of Vine and Wine), e os métodos oficiais da CEE e de Portugal (Portaria 985/82), a massa volúmica de um vinho a 20°C ( $\rho_{20}$ ) é calculada pelo quociente entre a massa no vazio de um certo volume de vinho à temperatura de 20°C e esse volume expresso em g. cm<sup>-3</sup>.

Por aerometria (Procedimento de determinação da densidade, 2002; OIV, 2012) verteu-se cerca de 250 mL de vinho, à temperatura ambiente, para uma proveta de vidro (250 mL) e introduziu-se o mostímetro (graduado em massa volúmica no vazio 20 °C, fabricado e aferido segundo as normas da C.E.E. de 17/09/1990). Após a leitura da massa

volúmica, ( $\rho_T$ ), pela parte superior do menisco, fez-se a leitura da temperatura e registam-se os valores. Depois, com o auxílio de uma tabela (Anexo V) de correção da temperatura e da fórmula (Figura 10) converteu-se a massa volúmica à temperatura registada em massa volúmica a 20 °C.

$$(\rho_{20}) = (\rho_T) \pm \frac{C}{1000}$$

**Figura 10** - Conversão da  $\rho_T$  em  $\rho_{20}$ . Sendo  $\rho_{20}$  a massa volúmica a 20°C;  $\rho_T$  a massa volúmica obtida na análise à temperatura ambiente e C o factor conversor (Anexo V). Usa-se (+) quando a T é superior a 20°C e (-) quando inferior (Fonte: OIV, 2012).

### **3.2.2 - Determinação da sobrepressão**

A determinação da sobrepressão nas garrafas, onde ocorreu a segunda fermentação, realizou-se segundo o método OIV-AS314-02. Para realizar a medição, adaptou-se o aferómetro (segundo as especificações da NP 3258/89) à cápsula da garrafa colocada na posição vertical de forma a que o furo do tubo (dispositivo de perfuração da cápsula) ou a sua extremidade fiquem no espaço que medeia entre a cápsula e o espaço de cabeça da garrafa (espaço acima do vinho). Agitou-se a garrafa a medir, já com o aferómetro introduzido, até que o ponteiro estabilizasse, e procedeu-se à leitura da sobrepressão. Retirou-se o aferómetro da garrafa, a cápsula foi retirada e a temperatura do vinho determinada, com o auxílio do termómetro. Depois de registados os valores de pressão e temperatura, com o auxílio de uma tabela (Anexo VI) de correção da temperatura e da fórmula (Figura 11), obteve-se o valor de sobrepressão a 20 °C,  $P(20)$ , expresso em bar.

$$P_{20} = P_T \times C$$

**Figura 11** - Conversão da PT em P20, a 20 °C, sendo PT a sobrepressão à temperatura T e C o factor conversor (Anexo VI). (Fonte: OIV, 2012).

### **3.4 - Isolamento do material polimérico**

#### **3.4.1 - Fracionamento por ultrafiltração**

Devido à elevada concentração de matéria coloidal do vinho base, um volume de 50 mL de cada vinho base obtido (Aff; AffOW e AffBd), foi diluído em 450 mL de água destilada. A suspensão obtida foi centrifugada a 15.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Para cada um dos três sobrenadantes obtidos após centrifugação, realizou-se ultrafiltração, à temperatura ambiente, utilizando uma unidade de ultrafiltração com agitação (célula com agitação Modelo 8200, 200 mL) com membranas de celulose regenerada com *cutt-off* de peso molecular de 10 kDa (Millipore, Darmstadt, Alemanha). O processo de ultrafiltração foi parado quando se atingiu o volume de 50 mL, tendo as amostras sido redissolvidas em 450 mL de água destilada e procedeu-se o processo de diafiltração, tendo sido repetido cinco vezes. Para controlar a eficiência da separação, a condutividade do permeado, material de baixo peso molecular (LMW), foi medida até apresentar um valor abaixo de 20  $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$ . O retentado foi recuperado como material de elevado peso molecular (HMW) (> 10 kDa). Tanto o permeado como o retentado foram concentrados até um volume de cerca de 50 mL num evaporador rotativo. Após a sua concentração foram congelados e liofilizados e o produto obtido após liofilização guardado num exsiccador.

### **3.4.2 - Fracionamento por diálise**

As nove variantes obtidas após a segunda fermentação (Aff\_C; Aff\_OW; Aff\_R; AffOW\_C; AffOW\_OW; AffOW\_R; AffBd\_C; AffBd\_OW; AffBd\_R) foram evaporadas em evaporadores rotativo de forma a desgaseificar, a eliminar o etanol e concentrar as moléculas não voláteis. Após concentração, o material foi dialisado (membrana de 12-14 kDa, Medicell), removendo moléculas pequenas como o ácido tartárico. Todas as diálises foram realizadas a 4 °C em 10 L de água destilada e com umas gotas de clorofórmio e tolueno para prevenir a proliferação de microrganismos. A água de diálise foi mudada até atingir condutividade próxima da água destilada (média de 5 mudas).

Os retentatos obtidos foram concentrados, novamente em evaporadores rotativos, até atingirem cerca de 50 mL de volume, congelados e liofilizados, obtendo-se o material de elevado peso molecular (HMW). Esse material obtido foi guardado em exsiccadores.

Os dois produtos enológicos em estudo (Optimum White® e OptiRED®) foram dialisados nas mesmas condições que os vinhos, após estes serem suspensos em 50 mL de água destilada.

### **3.5 - Análise de açúcares**

A análise de açúcares neutros das várias amostras foi realizada segundo o método de Selvendran *et al* (1979), após hidrólise ácida dos polissacarídeos, sob condições que garantem a despolimerização havendo a menor degradação dos resíduos de açúcares. Após hidrólise, os resíduos são convertidos a acetatos de alditol (AA), que são derivados voláteis e termoestáveis, podendo suportar as condições de análise por cromatografia em fase gasosa (GC-FID) [93].

Foram pesadas 2-3 mg de amostra para tubos de cultura, com 200 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (m/m) durante 3h à temperatura ambiente, com agitação esporádica para solubilização da amostra. De seguida adicionou-se 2,2 mL de água destilada, perfazendo assim concentração do ácido a 1 M. Os tubos de cultura foram então incubados num bloco de aquecimento a 100 °C. Ao fim de uma hora de reação foram retirados 0,5 mL de

hidrolisado para futura determinação de ácidos urónicos (ponto 3.6). Os restantes 1,9 mL de solução continuaram a hidrólise por mais 1,5 h.

Após o tempo de reação terminar, arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  da solução de padrão interno (2-desoxiglucose, 1 mg.  $\text{mL}^{-1}$ ). De seguida transferiu-se 1 mL de hidrolisado para novos tubos de cultura e estes foram neutralizados com 200  $\mu\text{L}$  ácido de  $\text{NH}_3$  a 25%. Para promover a redução dos resíduos a acetatos de alditol adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de uma solução preparada na hora de  $\text{NaBH}_4$  15% (m/v) em  $\text{NH}_3$  3 M. A redução foi promovida agitando os tubos de ensaio e incubando-os num bloco de aquecimento a 30 °C, durante 1 h.

Após a redução estar completa, os tubos foram arrefecidos num banho de gelo e o excesso de  $\text{NaBH}_4$  formado foi eliminado por 2 adições consecutivas de 50  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial. De seguida transferiu-se 300  $\mu\text{L}$  da solução, contendo os açúcares reduzidos, para tubos de *Sovirel*. Estes tubos foram colocados num banho de gelo e adicionou-se 450  $\mu\text{L}$  de 1-metilimidazol (catalisador) e 3 mL de anidrido acético (reagente acetilante). Os tubos foram agitados e incubados, durante 30 minutos, num bloco de aquecimento a 30 °C. Os acetatos de alditol formados durante a reação de redução foram removidos por extração líquido-líquido com 3 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano. A água destilada remove o excesso de anidrido acético e o diclorometano atua como solvente de extração dos acetatos de alditol. Os tubos de ensaio foram agitados manualmente e de seguida centrifugados a 3000 rpm durante 30 segundos. A fase aquosa superior foi removida por sucção e à fase orgânica adicionou-se novamente 3 mL água destilada e 2,5 mL de diclorometano e o processo descrito anteriormente foi repetido. De seguida, a fase orgânica foi lavada com 3 mL de água destilada. Os tubos foram agitados manualmente e centrifugados nas mesmas condições do passo anterior. A fase aquosa superior foi novamente aspirada e a orgânica novamente lavada com 3 mL de água destilada. Os tubos foram novamente agitados manualmente e centrifugados. Na última aspiração a fase aquosa foi completamente removida, e a fase orgânica, contendo os acetatos de alditol, foi transferida para tubos de *speedvac*. As amostras foram concentradas até à secura num evaporador centrífugo e lavadas 2 vezes com 1 mL de acetona anidra e concentradas após cada lavagem.

Para análise por GC-FID, os acetatos de alditol foram diluídos em cerca de 50  $\mu\text{L}$  de acetona anidra. Foi utilizado um cromatógrafo Perkin Elmer – Clarus 400 com uma



coluna capilar DB-225 (30 m comprimento, 0,25 mm de diâmetro, e 0,15 µm espessura) e uma fase estacionária composta por 50% de cianopropilfenil e 50% metilpolisiloxano. Foi injetado um volume de 2 µL de amostra. A temperatura do injetor foi 220 °C e a do detetor a 230 °C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogénio, à pressão de 17 psi, uma atenuação de 6 e “split” de 10 min. O programa de temperaturas inicia com a temperatura de 200°C, seguida de uma rampa de 40 °C. min<sup>-1</sup> até 220 °C, isotérmica a 220 °C durante 7 min, rampa de 20 °C. min<sup>-1</sup> até 230 °C, e isotérmica a 230 °C durante 1 min.

### **3.6 - Determinação de ácidos urónicos**

A quantificação dos ácidos urónicos (AU) foi realizada segundo uma adaptação do método colorimétrico proposto por Selvendran *et al*, (1979).

A calibração foi realizada através da preparação de 5 padrões a partir de uma solução de ácido galacturónico 200 µg. mL<sup>-1</sup>, nas concentrações: 0, 5, 10, 15 e 20 µg. mL<sup>-1</sup>. A 0,5 mL de amostra hidrolisada, recolhida após uma hora de hidrólise do ponto anterior, foram adicionados 1,5 mL de água destilada. Para cada amostra a analisar e padrão foram preparados 3 tubos, um branco e duas réplicas, com 500 µL de cada amostra. A todos os tubos foram adicionados 3 mL de ácido bórico 50 mM preparado em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Os tubos foram agitados manualmente de forma cuidadosa, colocada uma folha de alumínio sobre o topo dos tubos e incubados num banho a 100 °C por 10 min. Após esse período, os tubos foram arrefecidos num banho de gelo e na ausência de luz, adicionados 100 µL de MFF (*m*-fenilfenol 0,15% (m/v) em 0,5% (m/v) de NaOH) a dois dos três tubos de cada amostra (o tubo sem solução de MFF representava o branco de cada amostra e de cada padrão). Os tubos foram agitados, manualmente e vigorosamente, e colocados a reagir no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente. Findo o tempo de reação, os tubos foram novamente agitados e a absorvância das soluções foi determinada a 520 nm contra o ar. Ao valor obtido de absorvância das amostras e padrões foi subtraído o valor de absorvância do respetivo branco e a quantidade de ácidos urónicos em cada amostra foi determinada fazendo interpolação gráfica da curva de calibração na gama 0-20 µg. mL<sup>-1</sup>.

### **3.7 - Medição das propriedades da espuma**

A capacidade de formação de espuma e a sua estabilidade foram avaliadas através de uma adaptação do método e Mosalux Bikerman [23]. Faz-se a passagem de um fluxo de CO<sub>2</sub> de grau analítico, através de uma placa de fibra de vidro sinterizado equipada na parte inferior de uma coluna (530 × 15 mm). O caudal dos gases foi controlado para 10 L. h<sup>-1</sup>, através de um medidor de fluxo (Cole-Parmer Instruments Company, IL, EUA).

A capacidade de espuma foi avaliada como o aumento na altura de 10 mL de soluções de vinho colocadas no interior de uma coluna de vidro, após a injeção de CO<sub>2</sub>. Para avaliar o volume da espuma, dois parâmetros foram avaliados:

1) HM (altura máxima atingida pela espuma após a injeção de CO<sub>2</sub> através coluna de vidro, expresso em cm) representa a capacidade de formação de espuma.

2) HS (altura de estabilidade da espuma durante a injeção de CO<sub>2</sub>, expressa em cm) representa a capacidade do vinho para produzir um colar de espuma persistente e estável.

O tempo de estabilidade da espuma (TS) foi avaliado como o tempo decorrido para o colapso das bolhas necessárias ao aparecimento de líquido depois de cessar o fornecimento de CO<sub>2</sub> e é expresso em segundos (s).

### **3.8 - Análise sensorial**

A análise sensorial dos vinhos espumantes após a segunda fermentação ter terminado foi efetuada por uma prova cega. O painel de provadores foi constituído por 11 especialistas ligados a diversas áreas da empresa Aliança Vinhos de Portugal S.A. e Proenol Indústria Biotecnológica, Lda., incluindo também os enólogos. Todos os vinhos para prova foram apresentados em copos de vidro identificados com um código aleatório. Os vinhos foram avaliados em doze descritores (escala de 0 a 6) divididos em cor (intensidade de cor, amarelo, verde e rosa), aroma (intensidade do aroma, frutado, floral e fresco) e gosto (intensidade, acidez, amargo e persistência). A qualidade dos vinhos no geral foi também avaliada numa escala hedónica de 0 a 20 quanto à sua cor, aroma e sabor, assim como a apreciação geral do vinho. Os atributos da espuma foram classificados, quanto à sua quantidade, estabilidade e efervescência. O atributo da quantidade de cada

vinho foi classificado como abundante, normal ou escasso. O atributo estabilidade classificado por persistente ou momentânea e a efervescência por rápida, normal e lenta. Os vinhos também foram ordenados por ordem de preferência, tendo os provadores selecionado os três vinhos preferidos do painel de 9 amostras. A folha de prova encontra-se em anexo (Anexo VII).

### **3.9 - Análise Estatística**

A média e o desvio-padrão foram calculados com base nos dados obtidos a partir da medição dos três parâmetros de espuma realizada cinco vezes cada. A análise de variância (ANOVA) e teste Tukey foi aplicada usando o software Assistat 7.7 beta, de maneira a determinar as diferenças significativas (ao nível de confiança de 95 %) entre as respostas da prova organoléticas e os valores obtidos de HM, HS e TS, durante a medição dos parâmetros da espuma.



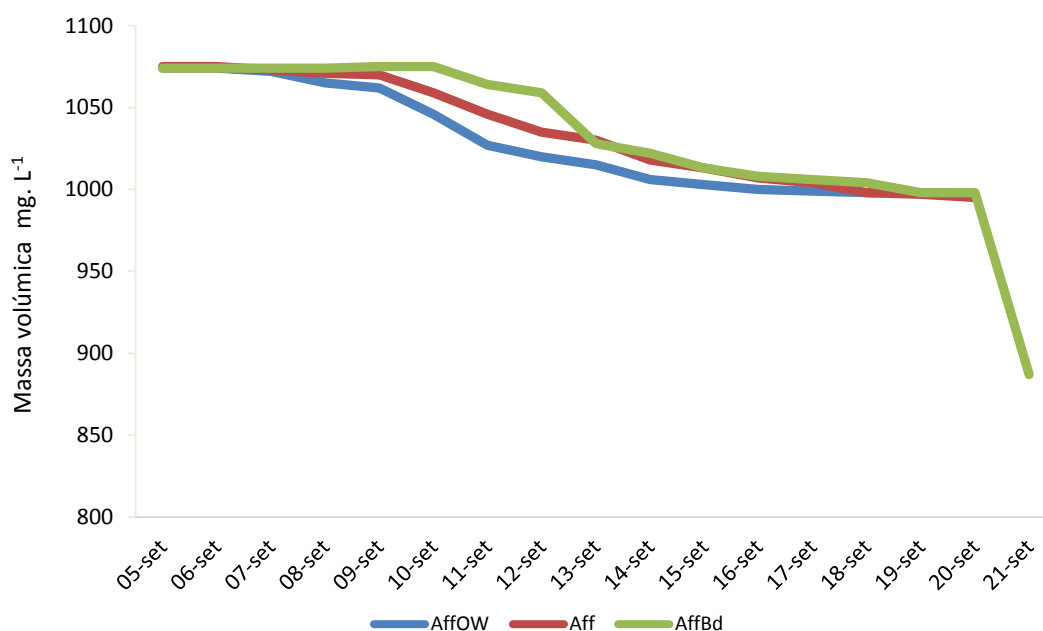
## **4 - Resultados e Discussão**



## 4 – Resultados e Discussão

### 4.1 - Monitorização da massa volúmica e cinética fermentativa – 1ª fermentação

A primeira fermentação dos três vinhos base utilizados neste trabalho foi parametrizada através da avaliação da massa volúmica e da temperatura e convertidos para massa volúmica corrigida a 20°C ( $p_{20}$ ). Todas as fermentações tiveram início no dia 5 de setembro de 2014. As culturas puras de *S. cerevisiae* foram inoculadas com  $2 \times 10^6$  células viáveis.  $\text{mL}^{-1}$  e a fermentação com a *T. delbruenkii* com  $1 \times 10^7$  células viáveis.  $\text{mL}^{-1}$ . A evolução das fermentações, através do parâmetro  $p_{20}$  dos três vinhos base, está ilustrada na Figura 12.



**Figura 12** - Evolução temporal da massa volúmica corrigida a 20 °C ( $p_{20}$ ).

Pela observação da Figura 12 é possível verificar que todas as fermentações foram completadas. No entanto, apresentam cinéticas fermentativas diferentes. É possível verificar que as duas primeiras fermentações, a realizada com as leveduras *S. cerevisiae*, Aff e a realizada com a mesma levedura e com o produto enológico Optimum White<sup>®</sup>, AffOW, apresentam perfis de fermentação bastante semelhantes. Até ao dia 9 de setembro

em ambas houve um decréscimo pouco acentuado da massa volúmica e a partir desse dia o decréscimo foi sendo gradual e contínuo até que a massa volúmica atingiu os valores de 995 e 997 mg. L<sup>-1</sup>, respetivamente. Para confirmar que a fermentação tinha efetivamente terminado, foi avaliado o valor de açúcares residuais (glucose + frutose, determinado por kit enzimático- RX Monza GF 2635), obtendo-se valores que constataam o término da fermentação, sendo estes de 0,20 e 0,31 g. L<sup>-1</sup>, respetivamente, ambos inferiores a 0,50 g. L<sup>-1</sup>, valor de referência para a empresa Aliança Vinhos de Portugal S.A.. No caso da fermentação realizada com as duas leveduras AffBd, esta apresentou um perfil fermentativo um pouco diferente das outras duas. Nos primeiros seis dias, apenas com a levedura *T. delbruenkii*, a massa volúmica permaneceu inalterada. Isso pode dever-se à sua menor capacidade fermentativa comparativamente à *S.cerevisiae* [94]-[96]. Após os seis dias, a massa volúmica começou a decrescer. Ao oitavo dia do início da fermentação (dia 12 setembro) foi adicionada a levedura *S. cerevisiae*. Após o primeiro dia de fermentação com as duas leveduras, o valor de massa volúmica decresceu acentuadamente, mantendo um decréscimo gradual durante os dias seguintes. No dia 20 de setembro a massa volúmica apresentou o valor de 998 mg.L<sup>-1</sup>, similar ao das outras fermentações. No entanto, os valores de açúcares residuais ainda eram acima do valor de referência (0,77 g. L<sup>-1</sup>). No dia 21, o valor de massa volúmica decresceu acentuadamente, assim como o valor de açúcares residuais, tendo a fermentação considerada terminada com o valor 887 mg.L<sup>-1</sup> de massa volúmica, bastante mais baixo (cerca de 110 mg. L<sup>-1</sup>) que as outras fermentações e com uma concentração de açúcares residuais de 0,11 g. L<sup>-1</sup>. Estudos anteriores relatam que as concentrações de açúcares residuais de fermentações após o término da fermentação, que ocorreram com as duas culturas de leveduras, são inferiores ao valor de concentração para fermentações decorridas apenas com a *S. cerevisiae* [97], o que é consensual com os resultados obtidos.

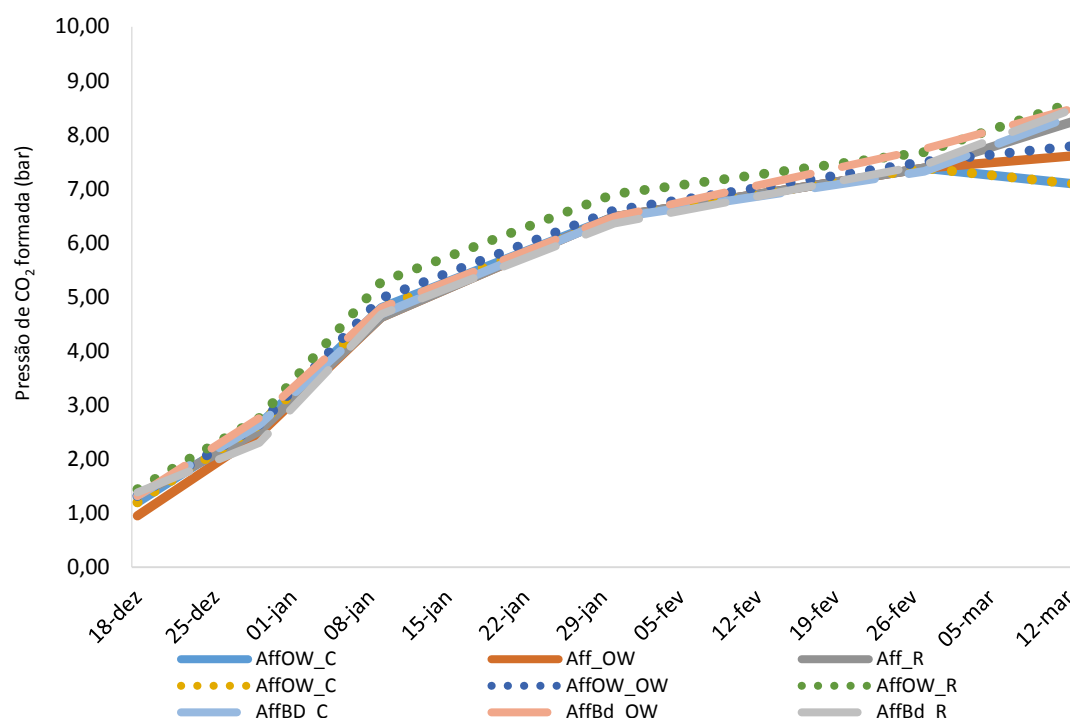
### **4.2 - Monitorização da sobrepressão e cinética fermentativa – 2ª fermentação**

A segunda fermentação em garrafa ocorreu nas caves das instalações da empresa Aliança Vinhos de Portugal S.A., onde se garantia uma temperatura entre os 13-14 °C. Teve início no dia 17 de dezembro de 2014 e foi considerada terminada no dia 13 de março



de 2015. Na teoria,  $4\text{g. L}^{-1}$  de açúcar geram 1 bar de pressão [11]. Durante a preparação do licor de tiragem foi adicionado ao vinho base uma concentração de açúcar de  $26\text{ g. L}^{-1}$ , sendo previsto obter uma pressão no final da fermentação de cerca 6,5 bar. Nessa data, a  $P_{20}$  mais baixa registada foi de 7,08 bar, valor acima de 6,5, tendo sido por isso expectável o término da fermentação. Para confirmar a conclusão da fermentação foi realizada, por utilização de *kit* enzimático (Glucose/Fructose Randox® Food Diagnostics), a avaliação da concentração de açúcares residuais. Todos os valores de açúcares (Glucose + Fructose) obtidos foram inferiores a  $1,0\text{ g. L}^{-1}$  (Anexo VIII), valor de referência para a empresa, garantindo assim o término da fermentação.

A segunda fermentação foi monitorizada de forma contínua, nas modalidades de vinho ao qual foi adicionado o produto enológico Optimum White® (Aff\_OW; AffOW\_OW; AffBd\_OW). Para tal, foi colocado um aferómetro numa garrafa de vinho de cada modalidade, de modo a poder ser feito o controlo contínuo da pressão de  $\text{CO}_2$  formada, que é inversamente proporcional ao consumo de açúcar, conseguindo assim a informação de como evoluiu a fermentação. As restantes modalidades, em conjunto com uma garrafa de cada modalidade avaliada de forma contínua, foram avaliadas a cada dez dias desde o início da fermentação, sendo medidas a pressão e a temperatura. O valor obtido foi sempre corrigido segundo a fórmula de cálculo presente na figura 6. A evolução da segunda fermentação, com base na formação de  $\text{CO}_2$  resultante do consumo de açúcar ao longo do tempo, verificada de dez em dez dias, das nove modalidades de vinho produzidas neste trabalho está representada no gráfico da Figura 13.



**Figura 13** - Evolução temporal da segunda fermentação em função da pressão de CO<sub>2</sub>.

Pela observação da Figura 13 é possível verificar que a fermentação de todas as variáveis foi bastante similar. No entanto, é visível que, desde o início da mesma, o vinho AffOW\_R foi o que obteve valores de pressão mais elevados, tendo obtido no final da fermentação o valor 8,64 bar de pressão (P<sub>20</sub>). Dentro de cada tipo de segunda fermentação de cada vinho base, os vinhos aos quais foram adicionados o produto enológico OptiRED® foram os que apresentaram sempre um valor superior de pressão. Os vinhos sem adição de produto enológico na segunda fermentação apresentaram uma evolução de pressão mais baixa que as duas outras modalidades. Uma formação mais acentuada de pressão nas variáveis de vinho às quais foram adicionados produtos enológicos durante a segunda fermentação pode dever-se ao facto destes produtos enológicos terem na sua composição nutrientes importantes para o metabolismo da levedura. Segundo o fabricante, o OptiRED® possui na sua constituição leveduras inativas que cedem para o meio fermentativo aminoácidos, vitaminas e fatores de sobrevivência, que contribuem positivamente para a nutrição das leveduras. Já o produto Optimum White® tem a indicação de ser constituído por uma levedura enológica inativa rica em glutatona, com uma importante função

metabólica nas leveduras, atuando essencialmente como antioxidante. A glutatona é um metabolito que influencia a multiplicação da levedura durante a fermentação e é uma fonte importante de azoto e enxofre. A sua atividade antioxidante no vinho prende-se com o seu baixo potencial redox.

### **4.3 - Isolamento e caracterização do material polimérico e de baixo peso molecular**

Foi analisada a composição de polissacarídeos dos produtos utilizados e dos vinhos ao longo das várias etapas de produção do vinho espumante, estando os resultados obtidos resumidos nas Tabelas 1,2,3 e 4. As análises de açúcares foram realizadas em triplicado e nas tabelas estão representados os valores médios.

#### **4.3.1 - Polissacarídeos dos produtos enológicos**

A composição em hidratos de carbono dos produtos enológicos utilizados foi realizada segundo duas formas: a primeira, do produto direto, e a segunda do produto dialisado, tendo sido assim analisado o conteúdo da fracção de elevado peso molecular (HMW).

Pela observação da Tabela 1 verifica-se que o rendimento de massa do material polimérico isolado foi de 33% e 27% para o OptiRED® e Optimum White®. Os rendimentos em massa de hidratos de carbono destes produtos foram de 20% e 26% no OptiRED® e na sua fracção de HMW, respetivamente. Já o produto Optimum White®, obteve valores um pouco inferiores, de 19% e 14% na amostra do produto e na fracção HMW, respetivamente. A concentração de polissacarídeos do OptiRED® foi de 21% e a da fracção de HMW um pouco superior, 26%. A concentração em polissacarídeos do Optimum White® foi 19% e 14% para a fracção HMW. A composição de hidratos de carbono do OptiRED®, Optimum White® e fracção HMW de Optimum White® é essencialmente constituída por glucose (Glc), manose (Man) e UA. Assim sendo, no processo de obtenção destes dois produtos extraiu-se maior quantidade de glucanas do que manoproteínas. Estudos anteriores obtiveram resultados semelhantes nas percentagens de glucanas e

manoproteínas de produtos enológicos avaliados [98]. No entanto, a fração HMW do OptiRED® apresentou uma composição mais elevada de Man, seguindo-se de Glc no Optimum White®. O OptiRED® apresentou um incremento de manoproteínas na fração de HMW e uma diminuição no conteúdo de glucanas. Possivelmente, na amostra direta deteta-se uma maior quantidade Glc por esta ser de baixo peso molecular. O processo de produção deste produto inclui um tratamento enzimático que facilita a libertação dos polissacarídeos no meio, dado isto, a maior quantidade detetada de Glc provavelmente provém de fragmentos de glucanas que foram hidrolisadas pelas enzimas que foram perdidos no processo de diálise para o isolamento do HMW. O outro produto Optimum White®, apresenta uma composição bastante similar à sua fração de alto peso molecular. Nos dois produtos também estavam também presentes outros resíduos de açúcares em menor quantidade provenientes do material polimérico dos produtos enológicos. Dentro destes destacam-se a fucose (Fuc) ribose (Rib), arabinose (Ara) e ácidos urónicos (AU). Estes monossacarídeos não são constituintes das paredes das leveduras, o que indica que a presença de polissacarídeos ou oligossacarídeos provenientes de outras fontes que não as leveduras, como por exemplo, do meio de crescimento das mesmas.

Os dois produtos provenieram do mesmo fornecedor e são ambos produzidos a partir da levedura *S. cerevisiae*. No entanto, como já verificado, diferem na sua composição e percentagem de tipo de polissacarídeos. Uma das principais razões para essas diferenças prende-se com o fato de o produto OptiRED® ser produzido através do uso da levedura inteira, e apresentar um tratamento enzimático que facilita a libertação de polissacarídeos. Já o Optimum White® é proveniente da autólise da parede das leveduras e apresenta um elevado teor de glutatona.

**Tabela 1** - Frações, rendimentos, percentagem de concentração e concentração de hidratos de carbono (HC) extraídos dos produtos enológicos utilizados com e sem diálise.

Produto enológico	$\eta$ (% m.m <sup>-1</sup> )	$\eta$ HC (% m.m <sup>-1</sup> )	Hidratos de Carbono (% mol)									Total HC $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$
			dRib	Rha	Fuc	Rib	Ara	Man	Gal	Glc	AU	
OptiRED®	33	20			4		8	12		66	10	205
HMW		26	1		2	3		61	1	29	3	258
OptimumWhite®	27	19				3		30		64	3	190
HMW		14	1	2		4	4	31		58		138

#### 4.3.2 - Açúcares livres dos vinhos bases

Com o objetivo de separar e caracterizar os açúcares livres da fração de baixo peso molecular de cada vinho obtido após a primeira fermentação, foi realizado um procedimento de separação por ultrafiltração da fração de vinho de alto ( $\geq 10\text{kDa}$ ) e baixo ( $< 10\text{kDa}$ ) peso molecular. A proporção e composição de açúcares livres extraídos na fração de baixo peso (LMW) encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2** - Rendimentos, percentagem molar dos açúcares e concentração de açúcares livres totais no vinho base.

Vinho	$\eta$ (% m.v <sup>-1</sup> )	$\eta$ HC (% m.v <sup>-1</sup> )	Açúcares Livres (% mol)		Total açúcares livres $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$
			Fru	Glc	
Aff	9	3	85	15	80
AffOW	7	2	85	15	77
AffBd	5	2	85	15	17

O vinho Aff obteve um rendimento de massa de material de baixo peso molecular por volume de vinho de 9% e rendimento em massa de açúcares por volume de vinho de 3%. A concentração total de açúcares livres no material de baixo peso molecular foi de 80  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ , distribuídos por frutose (Fru) e por glucose (Glc). O vinho AffOW obteve

rendimento por volume de vinho de 7% e 2% para o rendimento em massa de açúcares. Este material de baixo peso molecular apresentou uma ligeira diminuição do valor de açúcares livres totais,  $77 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ . O AffBd apresentou o rendimento de material de baixo peso molecular por volume de vinho menor, com 3% e em massa de açúcares de 2%. O seu valor de açúcares livres totais foi o mais baixo de todos  $1,7 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ .

Os três vinhos apresentaram uma percentagem de concentração de frutose (Fru) e glucose (Glc) igual. A frutose foi o açúcar presente em maior percentagem (85%) em todos os vinhos, e a de glucose apenas de 15%. A glucose é a fonte de hidratos de carbono utilizada preferencialmente pelas leveduras devido ao seu metabolismo diauxiano, onde a glucose exerce repressão catabólica, inibindo a expressão dos genes envolvidos na produção de enzimas necessárias para metabolizar outros açúcares [99]. Por essa razão, a percentagem de frutose nos três vinhos surgiu assim bastante mais elevada, mais de 5,5 vezes superior à de glucose.

O primeiro vinho, Affinity, que representa o controlo da primeira fermentação, foi a modalidade que apresentou maior concentração de açúcares na amostra após a primeira fermentação, com um valor de  $80 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ , seguindo-se a modalidade AffOW, com o produto enológico Optimum White<sup>®</sup>, com o valor de  $77 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ , praticamente igual ao valor do vinho controlo. Por fim, o vinho produzido pela fermentação com as duas espécies fermentativas (AffBd) foi o que apresentou um valor mais baixo de todos ( $17 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ ). Como já observado anteriormente, no sub-capítulo 4.1, a fermentação com as duas espécies de leveduras foi a que teve uma cinética fermentativa mais eficaz, seguindo-se da fermentação com o produto enológico (Optimum White<sup>®</sup>), sendo a fermentação controlo a menos eficaz. Pela observação da Tabela 2 é possível verificar que essa informação está em consenso com os valores de açúcar residual obtido em cada uma delas. A fermentação com as duas estirpes fermentativas obteve um menor valor de concentração de hexoses, tendo havido um maior consumo de glucose, sendo a fermentação mais completa.

### **4.3.3 - Polissacarídeos dos vinhos bases**

Após a primeira fermentação, as amostras dos três vinhos base obtidos foram ultrafiltrados (10 kDa), obtendo assim uma fração de alto peso molecular (HMW) e uma de baixo molecular (LMW). Foram então analisados os polissacarídeos destas duas frações, estando os valores obtidos da fração de alto peso expressos na Tabela 3.

O vinho Aff apresentou um rendimento em massa de 23% e de polissacarídeos de 37% por volume de vinho. A concentração total de hidratos de carbono no HMW é de 37%, o valor mais baixo dos 3 vinhos, estando a sua composição distribuída por Man (29%), proveniente das manoproteínas das leveduras, seguindo-se de Gal (26%), Ara e Xyl (14%), Glc (12%), AU (4%) e desoxirribose (dRib) (1%). A Ara e a Gal são provenientes das arabinogalactanas e outros polissacarídeos pécticos presentes nas uvas [18], [100]. As pequenas frações de resíduos de desoxirribose (dRib) e Rib, têm possivelmente origem no DNA e RNA (material genético das leveduras) e uma quantidade residual AU provenientes dos polissacarídeos pécticos das uvas [38], [101].

A fração HMW do vinho AffOW obteve rendimentos de massa de 25% e de 37% de rendimento em hidrato de carbono por volume de vinho. A concentração de hidratos de carbono deste vinho foi de 53%, distribuída essencialmente por Man (38%), Gal (33%), Ara (12%), Xyl (65%), AU (4%) e Glc (3%). Apresentou uma maior percentagem de Man, revelando ter um maior conteúdo de manoproteínas que o vinho base Aff. A presença de Xyl, Ara e Gal e AU é devido a arabinogalactanas e ramnogalacturonanas.

A fração HMW do vinho AffBd apresentou rendimentos de massa de 19% e de 60% em hidratos de carbono por volume de vinho, o mais alto dos três vinhos base. A fração HMW obteve uma concentração em hidratos de carbono totais de 56%, também o valor mais alto dos três vinhos, distribuída essencialmente em Man (67%), Gal (17%), Ara (7%) e Rib (5%). O conteúdo de Man foi o mais elevado dos três vinhos, sendo este o vinho com maior quantidade de manoproteínas. Provavelmente esse valor elevado deveu-se ao fato de este último vinho ter sido fermentado com duas estirpes de leveduras e a *T. delbruecki*, em vários estudos, mostrando uma elevada capacidade de libertação de manoproteínas [62], [65].

**Tabela 3** - Frações, rendimentos, percentagem de concentração e concentração de hidratos de carbono (HC) extraídos das frações de alto peso molecular obtidas por UF do vinho base (após primeira fermentação).

Vinho	$\eta$ (% m v <sup>-1</sup> )	$\eta$ HC (% m. v <sup>-1</sup> )	Hidratos de Carbono (% mol)										Total HC μg. mg <sup>-1</sup>
			dRib	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU	
Aff	23	37	1				14	14	29	26	12	4	366
AffOW	25	52	1	1	1	1	12	6	38	33	3	4	525
AffBd	19	60		1			5	7	67	17	1	2	559

#### 4.3.4 - Polissacarídeos dos vinhos espumantes

Os vinhos espumantes, obtidos no fim de todo o processo enológico, foram também avaliados relativamente ao seu conteúdo em polissacarídeos. Foi avaliado a fração de elevado peso molecular, obtida após a diálise de todas as nove modalidades produzidas e os resultados encontram-se resumidos na Tabela 4.

As três variantes de vinho espumante provenientes do vinho base Affinity apresentaram um rendimento em HMW que variou de 14% a 20%. Os rendimentos em hidratos de carbono foram de 17% para o Aff\_C, 18% para o Aff\_OW e de 49% para o Aff\_R. As frações HMW apresentaram concentrações totais de hidratos de carbono similares, variando entre 41% e 54%. A amostra de Aff\_C, apresenta uma percentagem mais reduzida de Man (67%). Este vinho não sofreu adição de nenhum produto enológico na primeira e segunda fermentações, devendo-se provavelmente a esse fator a menor percentagem de polissacarídeos com origem nas leveduras. Foi detetado também Gal e Ara, que têm origem nas arabinogalactanas das uvas. A amostra Aff\_OW apresentou uma maior percentagem de manoproteínas que o controlo (Aff\_C), provavelmente devido à adição do produto enológico Optimum White<sup>®</sup> que atuou durante a segunda fermentação em garrafa, libertando para o vinho uma fração extra de manoproteínas, obtendo-se um total de 75% de Man dentro dos polissacarídeos do HMW. A amostra Aff\_R, também proveniente do mesmo vinho base com a adição de OptiRED<sup>®</sup> na segunda fermentação, apresentou o teor mais elevado em manoproteínas (83%). Este produto enológico, adicionado na segunda fermentação, foi, dos dois produtos enológicos, o que apresentou



maior teor em manoproteínas, sendo por isso esta modalidade a que apresenta maior quantidade de Man e a que sofreu um maior aumento deste desde a primeira fermentação. Para além disso, a concentração total de hidratos de carbono ( $541 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ ) desta amostra foi relativamente superior ao das outras modalidades de vinho espumante ( $414$ ;  $443 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ ). Todas as três amostras do mesmo vinho base apresentaram também Ara, Gal e AU provenientes de polissacarídeos pécnicos e arabinogalactanas libertadas pelas uvas durante a primeira fermentação, e Glc, proveniente das glucanas leveduras.

As três variantes de vinho espumante provenientes do vinho base AffOW apresentaram um rendimento em HMW que variou de 15% a 22%. Os rendimentos em hidratos de carbono foram praticamente iguais 26-27% e a concentração total de hidratos de carbono no HMW obteve também percentagens próximas, 65-66%. Os três vinhos resultantes do vinho base, ao qual foi adicionado Optimum White<sup>®</sup>, apresentaram uma percentagem de Man muito semelhante (80-82%). Comparativamente com o valor da fração de elevado peso do vinho base, após a primeira fermentação, as manoproteínas aumentaram para mais do dobro no produto final. No entanto, pode-se verificar que a adição dos produtos enológicos na segunda fermentação, após o vinho base ter sido fermentado com o Optimum White<sup>®</sup>, não trouxe diferenças significativas na quantidade de manoproteínas do vinho final das 3 modalidades. A composição destes três vinhos nos restantes açúcares foi também bastante semelhante, pelo facto de serem provenientes dos polissacarídeos das uvas, visto que todos os vinhos partiram do mesmo mosto é um resultado expectável.

Os rendimentos em massa do HMW dos vinhos espumantes provenientes do vinho base AffBd variaram de 15-30%, sendo o mais baixo o AffBd\_C e o mais alto o AffBd\_R. Os rendimentos em hidratos de carbono variaram entre 19-29%, sendo que o valor mais baixo foi o HMW do vinho AffBd\_R, correspondente a uma concentração total de hidratos de carbono de 67%, seguindo-se o HMW do AffBd\_OW, com 21% de rendimento em hidratos de carbono e 52% de açúcares totais e por fim a AffB\_C, com os valores de 29% e 67%, respetivamente. As modalidades de segunda fermentação do vinho base AffBd apresentaram também como açúcar maioritário a Man, tendo este aumentado da primeira fermentação para as diferentes segundas fermentações. Verifica-se que este vinho apresentou um aumento menos acentuado de Man na segunda fermentação comparativamente aos vinhos que tinham sido só fermentados com a Affinity (vinho base

## Avaliação do efeito da adição de vários produtos enológicos na espuma do vinho espumante

controlo) porque já partiam de um valor mais elevado que este. A amostra AffBd\_OW foi a que apresentou uma maior quantidade de manoproteínas (80%), um pouco acima da AffBd\_C (77%) e da AffBd\_R (76%), apesar da composição de manoproteínas do OptiRED® ser superior à do Optimum White® (Tabela 2). A maior quantidade em manoproteínas registada na amostra onde foi adicionado o Optimum White® provavelmente deve-se ao facto de o OptiRED já se encontrar parcialmente hidrolisado, devido ao tratamento enzimático a que é sujeito durante a sua produção e para além disso volta a ser hidrolisado pela adição da enzima adicionada durante a preparação dos vinhos para a segunda fermentação, apresentando fragmentos menores de manoproteínas que são difundidos durante a diálise, não sendo recuperados na fração HMW.

**Tabela 4** - Frações, rendimentos, percentagem de concentração e concentração de hidratos de carbono (HC) das fracções de alto peso obtidos por diálise das nove modalidades de vinho espumante

As frações de alto peso obtidas por diálise das nove modalidades de vinho espumante											
Vinho	$\eta$ (% m.v <sup>-1</sup> )	$\eta$ HC (% m.v <sup>-1</sup> )	Hidratos de Carbono (% mol)							Total HC μg.mg <sup>-1</sup>	
			Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU		
Affinity											
Aff_C	16	17	1	2		67	11	2	17	414	
Aff_OW	14	18		2		75	11	3	9	443	
Aff_R	20	49		2	2	83	4	2	7	541	
Affinity + Optimun White®											
AffOW_C	21	26	1	3		82	9	4	1	648	
AffOW_OW	15	27	1	2		80	12	2	3	663	
AffOW_R	22	26		2		82	10	3	3	660	
Affinity + Biodiva™											
AffBd_C	15	29		3		77	14	5	1	669	
AffBd_OW	19	21		3		80	11	4	2	522	
AffBd_R	30	19	1	1	2	76	6	3	11	466	

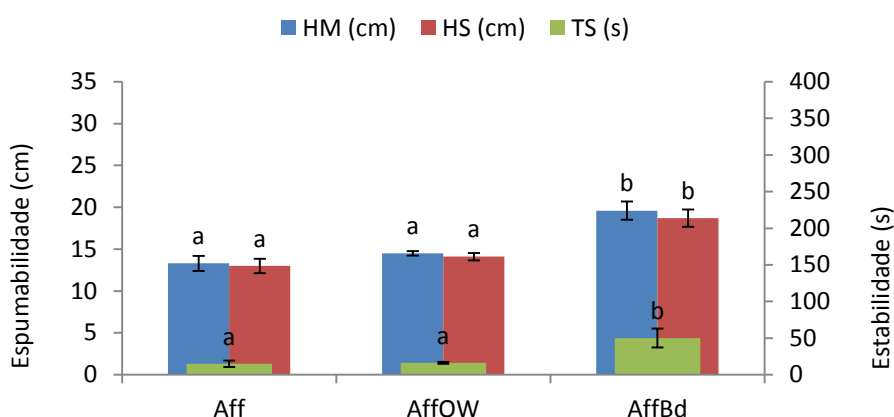
#### **4.4 - Avaliação das propriedades de espuma dos vinhos**

Após as etapas principais da vinificação que potencialmente poderiam afetar a espumabilidade e estabilidade da espuma, os vinhos de cada modalidade produzida até essa fase foram avaliados, estudando assim a sua quantidade e estabilidade da espuma. Analisou-se a altura máxima (HM) atingida pela espuma após a injeção de CO<sub>2</sub> através de uma placa de vidro sinterizado, expressa em centímetros, a estabilidade da espuma (HS), obtida pela altura durante a injeção de CO<sub>2</sub>, expressa também em centímetros, e o tempo de estabilidade da espuma (TS), expresso em segundos.

Foram efetuadas medições no final da primeira fermentação, após a filtração tangencial, após eletrodialise, após adição dos produtos enológicos após filtração sequencial de filtros de membrana e após o término da segunda fermentação.

##### **4.4.1 - Propriedades de espuma do vinho base**

Após a primeira fermentação ter terminado, foram avaliados os três parâmetros anteriormente mencionados, estando os valores apresentados na Figura 14, tendo sido a medição desses parâmetros realizada no dia 19 de novembro de 2014. Antes da avaliação dos três parâmetros, como o vinho após fermentar ainda se encontrava bastante turvo, este foi sujeito a uma filtração por vácuo, com membranas de 25 mm de diâmetro e 0,65 µm de porosidade absoluta (PALL, referência: ULTIPOR N).



**Figura 14** - Valores de HM, HS e TS dos vinhos base. Legenda: Letras diferentes indicam que as amostras são significativamente diferentes ( $p > 0,005$ ) dentro de cada parâmetro de espuma.

A avaliação do vinho controlo (Aff) e a do vinho com adição do produto enológico (AffOW) obtiveram resultados similares em todos os parâmetros de altura e estabilidade da espuma. Apresentaram os valores de 13,3 e 14,5 cm para a HM, 13 e 14,1 cm para HS e 15 e 16 s para a TS, respetivamente. A fermentação com as duas leveduras apresentou-se no fim da primeira fermentação como a modalidade de vinho base mais promissora, apresentando valores de espumabilidade e estabilidade muito superiores aos restantes vinhos base. O valor de HM registado foi de 19,6 cm e o HS foi de 18,7 cm, 49% e 44% superior ao valor obtido no vinho base controlo, respetivamente. Este vinho apresentava uma maior percentagem em manoproteínas (Tabela 4) que os restantes vinhos base. Como já referido anteriormente, a *T. delbruekii* apresenta uma elevada capacidade de libertação de manoproteínas, que pode dessa forma ter aumentado a espumabilidade e estabilidade da espuma [46]. O valor de TS deste vinho base (AffBd) foi o valor que mais aumentou comparativamente com o controlo (Aff), tendo o seu resultado sido de 50 s, o que representa um aumento de 233%. A estabilidade da espuma está relacionada com o sinergismo entre as manoproteínas e tensioativos de baixo peso molecular, nomeadamente monoacetil gliceróis do ácido palmítico e esteárico e derivados de ácidos gordos com gliceriletenoglicol [18]. As leveduras *S. cerevisiae* produzem pequenas quantidades de etileno glicol, mas outras espécies usadas na vinificação do vinho apresentam maiores quantidades deste composto que é um componente dos tensioativos identificados no vinho. Existem leveduras presentes no vinho, como a *Zygosaccharomyces bailii*, que produzem cerca de 200 vezes mais quantidade de etileno glicol que as *S. cerevisiae*. Para a *T.*

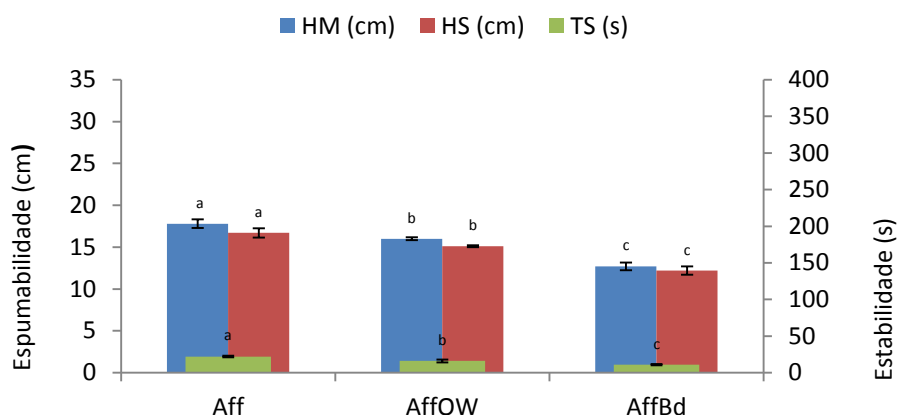
*delbrueckii* não existe informação disponível quanto à sua capacidade de formação de acil gliceróis e acil etilenoglicóis, no entanto, com base nos resultados obtidos de TS do vinho AffBd, esta levedura produzirá maior quantidade de compostos tensioativos importantes para a estabilidade da espuma.

#### **4.4.2 - Propriedades da espuma do vinho base após os processos de filtração tangencial e eletrodialise**

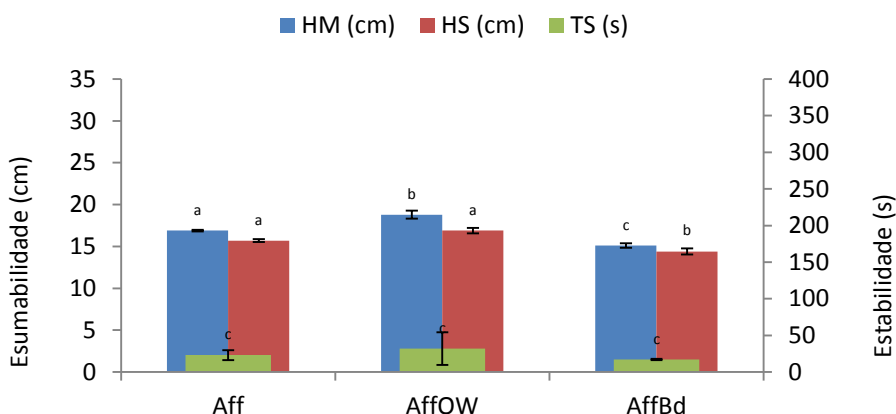
Após cerca de dois meses do fim da primeira fermentação os vinhos foram sujeitos ao processo de filtração tangencial, com um tamanho de poro médio de 0,20  $\mu\text{m}$ , seguido de eletrodialise. Os resultados das propriedades de espuma após cada processo estão representados nas Figuras 15 (filtração tangencial) e 16 (eletrodialise). Durante esses processos, existem componentes macromoleculares do vinho que ficam retidos, essencialmente durante a filtração tangencial, que são principalmente proteínas instáveis, que quando presentes no vinho podem causar turbidez [102]. Os vinhos base Aff e AffOW aumentaram os seus valores dos parâmetros de espumabilidade e estabilidade após sujeitos a filtração tangencial. Durante este processo de filtração, outras macromoléculas podem ser retidas nas membranas, como por exemplo, os polissacarídeos, sendo descrito que alguns deles são importantes para a espuma, e outros contribuem negativamente para a mesma, sendo que nestes dois vinhos as características da espuma foi beneficiada com a remoção de macromoléculas [18], [46]. Já os vinhos AffBd reduziram todos os parâmetros de espumabilidade e estabilidade.

Após eletrodialise, houve um aumento ligeiro de todos os parâmetros nos vinhos AffOW e AffBd, e uma diminuição da HM e HS ligeira no vinho Aff, comparativamente com os valores obtidos imediatamente após filtração. A eletrodialise provoca um abaixamento do pH. Os péptidos do vinho encontram-se em concentrações na ordem das dezenas de  $\text{mg. L}^{-1}$  e variam de 250Da a 10 kDa de tamanho. Os péptidos são zwitteriões, dependendo o seu comportamento do pKa dos aminoácidos. A pH 3, as cargas positivas são predominantes e os péptidos, sendo globalmente carregados positivamente podem fixar-se a locais negativos por interações electroestáticas, aumentando dessa forma a estabilidade dos vinhos [103].

## Avaliação do efeito da adição de vários produtos enológicos na espuma do vinho espumante



**Figura 15** - Valores de HM, HS e TS dos vinhos base após filtração tangencial. Legenda: Letras diferentes indicam que as amostras são significativamente diferentes ( $p < 0,005$ ) dentro de cada parâmetro de espuma.



**Figura 16** - Valores de HM, HS e TS dos vinhos base após eletrodialise. Legenda: Letras diferentes indicam que as amostras são significativamente diferentes ( $p < 0,005$ ) dentro de cada parâmetro de espuma.

### 4.4.3 - Propriedades da espuma do vinho base após tiragem e filtração

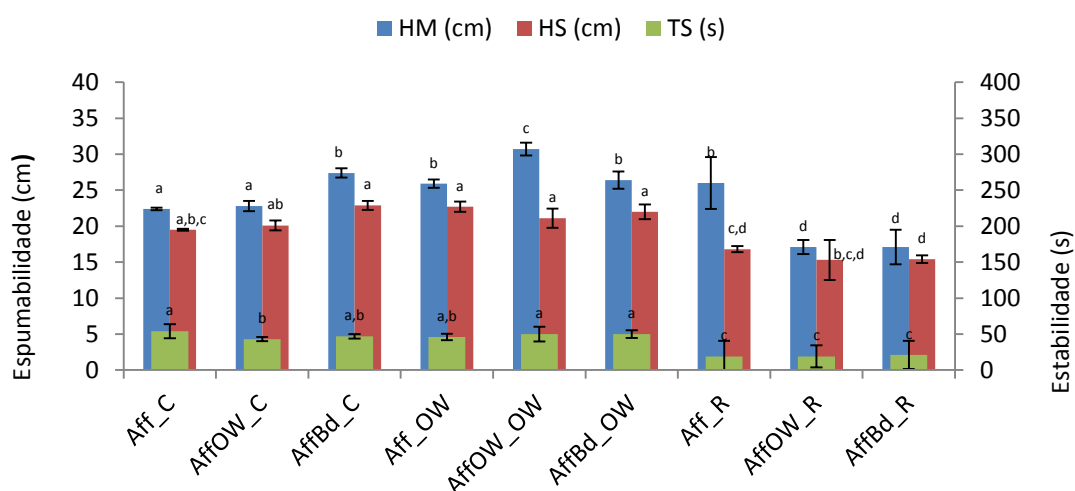
Após a estabilização do vinho e de estarem reunidas as condições para a realização da tiragem, foi avaliada a espumabilidade e estabilidade da espuma dos vinhos. Estes parâmetros também avaliados após a adição do licor de tiragem e dos produtos enológicos ao vinho base, e após o mesmo ter sido filtrado, sendo que a membrana final de filtração apresentava um diâmetro de poro absoluto de  $0,45 \mu\text{m}$  (processo necessário imediatamente antes da aplicação das leveduras encapsuladas, garantindo assim que não haverá mais

nenhum microrganismo a desenvolver-se no vinho). Os resultados obtidos após adição do licor e produtos e após a filtração encontram-se representados nos gráficos das Figuras 17 e 18, respetivamente. Em todos os vinhos verificou-se um aumento tanto da estabilidade como da espumabilidade, comparativamente com os valores obtidos após a electrodiálise (Figura 16), que foi o último passo da vinificação a ser avaliado antes da adição do licor de tiragem e produtos. As modalidades provenientes do vinho base Aff apresentam um maior aumento de espumabilidade e estabilidade nas variáveis onde são adicionados os produtos enológicos (Aff\_OW e Aff\_R). O mesmo se verificou nas modalidades do vinho base AffOW. No entanto, para as modalidades provenientes do vinho base AffBd tal não se verificou, pois a modalidade de vinho ao qual não se adicionou qualquer produto foi a que apresentou uma maior espumabilidade e estabilidade, tendo as outras duas modalidades do mesmo vinho base, às quais se adicionaram os produtos enológicos, valores muito semelhantes aos da avaliação anteriores, após a electrodiálise.

Após a adição dos produtos enológicos e destes se terem depositado ao fim de um dia, o vinho foi filtrado sequencialmente por filtros de membrana de 1,0  $\mu\text{m}$  e 0,45  $\mu\text{m}$  e os valores de espumabilidade e estabilidade alteraram-se em todas as variantes. Ao contrário do esperado, houve vinhos que sofreram aumentos na estabilidade e espumabilidade. Aquando da adição dos produtos enológicos foi adicionada também um preparado enzimático com glucanases, que promovem a libertação de manoproteínas da parede celular das leveduras. A leitura dos parâmetros da espuma após adição de licor e produtos foi realizada umas horas depois da adição dos mesmos e a leitura após a filtração foi realizada apenas um dia depois, tendo a enzima atuado durante mais tempo, promovendo uma maior libertação de manoproteínas. As manoproteínas são um dos compostos que promovem a espumabilidade, mas parecem não contribuir significativamente para a estabilidade da mesma, sendo em alguns casos descrita como prejudicial [46]. Possivelmente os fragmentos mais pequenos de polissacarídeos contribuem mais para a estabilidade da mesma, tendo sido estes os que passaram em maior quantidade após a filtração. Todos os vinhos, com exceção do Aff\_OW, aumentaram a sua estabilidade. Destacam-se o Aff\_R, o AffOW\_R e o AffBd\_R, que obtiveram tempos de estabilidade de 122, 161 e 92 s, respetivamente, representando aumentos de 160, 222 e 384%, respetivamente. Em comum estes têm a adição de OptiRED® durante a segunda fermentação, e este produto é sujeito a um tratamento enzimático durante a sua preparação,

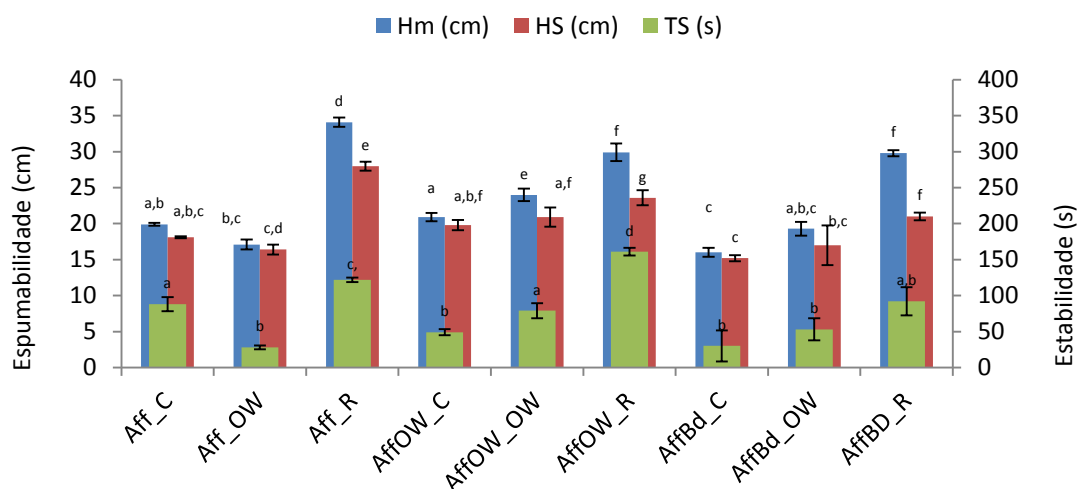
## Avaliação do efeito da adição de vários produtos enológicos na espuma do vinho espumante

por esse motivo naturalmente já apresenta uma maior quantidade de polissacarídeos mais pequenos, apresentando por isso no final da filtração maior quantidade de fragmentos de pequeno tamanho que os restantes vinhos sem este produto. Os vinhos aos quais foi adicionado o produto OptiRED<sup>®</sup> apresentaram também o maior aumento no HM e HS, possivelmente pelo teor de manoproteínas mais elevado, visto ter ocorrido um enriquecimento em manoproteínas proveniente deste produto enológico.



**Figura 17** - Valores de HM, HS e TS dos vinhos após adição do licor de tiragem e produtos enológicos  
 Legenda: Letras diferentes indicam que as amostras são significativamente diferentes ( $p > 0,005$ ) dentro de cada parâmetro de espuma.





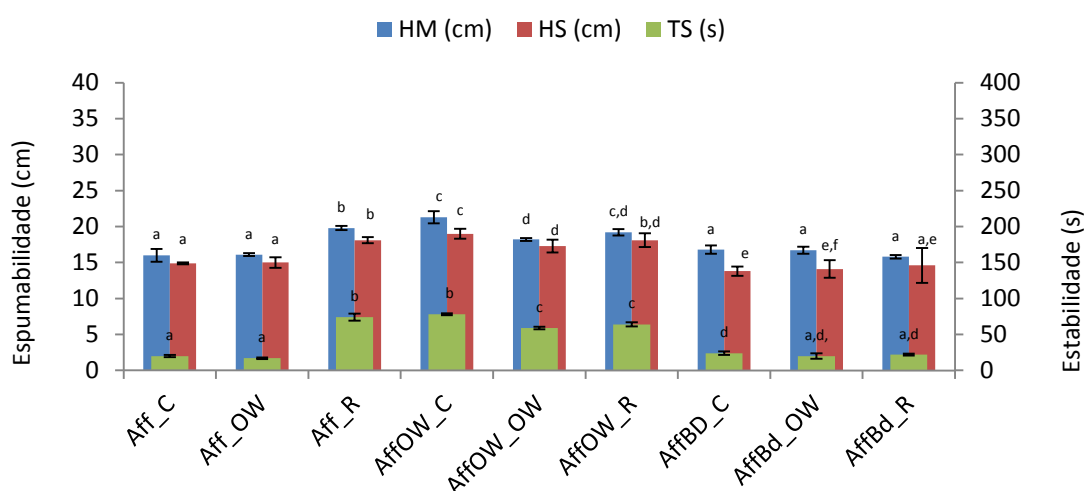
**Figura 18** - Valores de HM, HS e TS dos nove vinhos após filtração posterior à adição do licor de tiragem e produtos enológicos. Legenda: Letras diferentes indicam que as amostras são significativamente diferentes ( $p > 0,005$ ) dentro de cada parâmetro de espuma.

#### 4.4.4 - Propriedades da espuma do vinho espumante

No vinho final, após este ter realizado a segunda fermentação em garrafa e ter estado em repouso desde aí, durante um mês e meio, é possível observar um novo comportamento dos parâmetros HM, HS e TS. Os resultados encontram-se na Figura 19. Comparativamente com os dados da espuma obtidos anteriormente, os únicos vinhos onde se verificou um aumento de algum dos parâmetros de espuma foi o AffOW\_C, onde todos os parâmetros aumentaram, e no AffBd\_C, onde o valor de HM aumentou. Estudos anteriores, realizados pelo método Mosalux, demonstraram que o envelhecimento em garrafa com as leveduras aumenta o valor de TS e diminui o valor de HM [104], no entanto o único vinho em que houve um aumento do TS foi no AffOW\_C. O período de envelhecimento dos vinhos em garrafa após a fermentação antes da avaliação final da espumabilidade e estabilidade foi bastante curto, possivelmente por essa razão não foi tão perceptível o aumento do valor de TS. A partir deste gráfico é possível resumir quais as combinações de primeira e segunda fermentações mais favoráveis para a qualidade da espuma. Sendo assim, o vinho que reúne melhores parâmetros é o AffOW\_C, seguindo do Aff\_R, AffOW\_R e do AffOW\_OW. É possível verificar que, no caso dos vinhos cuja primeira fermentação teve o produto Optimum White<sup>®</sup> adicionado, obtiveram-se bons

## Avaliação do efeito da adição de vários produtos enológicos na espuma do vinho espumante

parâmetros de espuma independentemente do tipo de segunda fermentação realizada, verificando-se até mais eficaz quando durante a mesma não é adicionado qualquer produto enológico. A adição do produto OptiRED® ao vinho base controlo também se mostrou bastante eficaz, sendo o segundo vinho com melhores parâmetros de espuma. Os vinhos com piores valores de espumabilidade e estabilidade foram os AffBd\_R, AffBd\_OW, Aff\_C e Aff\_OW. A adição de OptiRED®, apesar do seu elevado conteúdo em manoproteínas, inclusive superior ao Optimum White®, revelou ser pouco eficaz na produção de vinhos com elevada qualidade de espuma, com exceção do vinho Aff\_R. Apesar dos valores dos parâmetros de espuma medidos logo após a sua adição serem elevados, após o processo de filtração possivelmente terão ficado retidos, compostos importantes para a estabilidade e quantidade de espuma, anulando assim o seu potencial efeito verificado logo após a adição do OptiRED®. O Optimum White®, pelos resultados obtidos, sugere ter um papel mais ativo e contributivo para a espuma durante a primeira fermentação (Figura 19).



**Figura 19** - Valores de HM, HS e TS dos nove vinhos espumantes obtidos. Legenda: Letras diferentes indicam que as amostras são significativamente diferentes ( $p < 0,005$ ) dentro de cada parâmetro.

#### 4.5 - Relação entre as propriedades da espuma e a concentração de manoproteínas dos vinhos espumantes

A composição química afeta diretamente a qualidade da espuma, embora os componentes responsáveis ainda não estão completamente decifrados. Existem muitos compostos que foram relatados como contribuintes para a qualidade da espuma, são eles os aminoácidos, polifenóis, ferro, ácidos orgânicos e lípidos [18], [46].

As proteínas são um dos principais compostos químicos a serem relacionados com a espuma devido às suas propriedades tensioativas [18], [46], [105]. As manoproteínas do tipo *N* e *O*, libertadas durante a fermentação e autólise, são as que mais influenciam positivamente a formação de espuma (quantidade) e têm sido descritas como sendo os principais promotores de espuma devido à sua estrutura, que favorece a adsorção das bolhas à interfase líquido/gás [46]. Com base nesta informação, relacionaram-se os três parâmetros de espuma já avaliados com a quantidade de manoproteínas, correspondente à quantidade de manose avaliada, existente em cada vinho final (Figura 19 e Tabela 4).

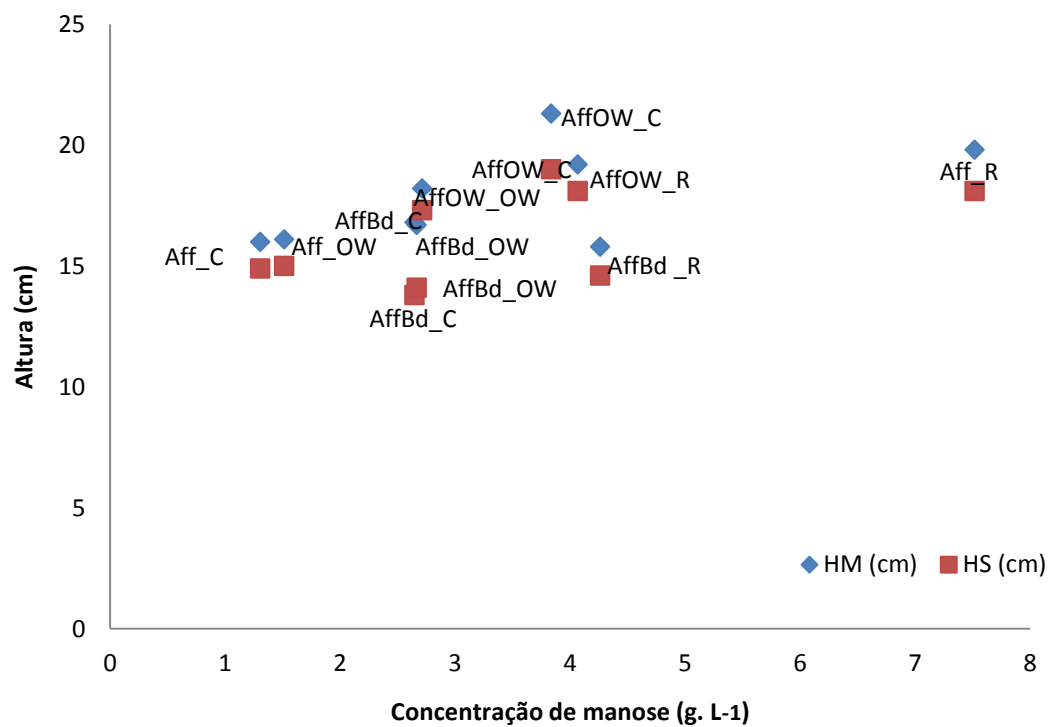
Na Figura 20 verificou-se que as duas concentrações mais baixas de manoproteínas representaram dos menores valores de HM, 1,3 g. L<sup>-1</sup>; 16 cm e 1,5 g. L<sup>-1</sup>; 16,1 cm, respetivamente. É possível verificar que as alturas máximas se encontravam na gama de concentrações entre 2,7 e 4,1 g. L<sup>-1</sup>, exceto o vinho espumante Aff\_R. O vinho espumante com a maior HM foi o AffOW\_C, com um valor de 21,3 cm, cuja concentração de manose é de 3,8 g. L<sup>-1</sup>. O vinho Aff\_R, apresentou uma altura máxima de 19,8 cm, com concentração de manose de 7,5 g. L<sup>-1</sup>, concentração superior à do AffOW\_C, no entanto a HM é mais baixa que este, e é semelhante ao vinho AffOW\_R. O vinho AffBd\_R, com uma concentração de manose cerca de quatro vezes maior que a dos vinhos com valor mais baixo de HM apresentou um valor de HM ligeiramente superior a estes, e inferior aos dos vinhos AffBd\_C; AffOW\_OW; AffOW\_R e AffOW\_C, o que indica que não é só a quantidade de manoproteínas que influencia a quantidade de espuma formada. Existem vários estudos que indicam que a concentração de manoproteínas apresenta uma correlação positiva com a espumabilidade, no entanto, em relação à estabilidade mostram-se contraditórios [18], [46], [105]. O comportamento das proteínas na espuma depende da sua hidrofobicidade, solubilidade (dependente do ponto isoelétrico e o pH do vinho), e do seu peso molecular [106]. No valor de pH do vinho, cerca de 3,0, as proteínas estão

positivamente carregadas e podem assim migrar para a parede da bolha, contribuindo para a formação da espuma [106]. Os aminoácidos totais também demonstram ter elevada correlação com o valor de HM, e com HS [18], [22]. Para o pH do vinho, os aminoácidos apresentam uma de carga positiva atuando com tensioativos, com grupos hidrofílico e hidrofóbico. Esta propriedade faz com que os aminoácidos fiquem retidos na interface ar / líquido, reduzindo a tensão de superfície do vinho, melhorando a capacidade de espuma [46]. O mesmo estudo refere que a quantidade total de polissacarídeos foram os únicos compostos que influenciam o TS, mas não mostraram qualquer efeito sobre os parâmetros da capacidade de espuma, tendo todas as famílias de polissacarídeos mostrado uma correlação positiva com o TS, e os polissacarídeos provenientes das uvas um maior coeficiente de correlação com o TS do que os polissacarídeos provenientes das leveduras. Os vinhos que apresentaram maior valor de TS foram os vinhos AffOW\_C e Aff\_R, com concentração de manoproteínas de 3,8, 7,5 g. L<sup>-1</sup>, respetivamente. No entanto, foram os vinhos AffOW\_OW e AffOW\_R que apresentam a maior percentagem de polissacarídeos provenientes das uvas: de arabinose e galactose (tabelas 4) e apresentaram elevados valores de TS. A presença conjunta das manoproteínas e das arabinogalactanas (AGP-II) (proveniente de leveduras e das uvas) tem a capacidade de se ligar à interfase ar/líquido e interagir com outras frações por pontes eletrostáticas, forças hidrofóbicas, pontes de hidrogénio ou ligações covalentes, que podem levar à formação de um filme viscoelástico resistente à tensão, evitando a coalescência da bolha, promovendo uma espuma mais estável [105].

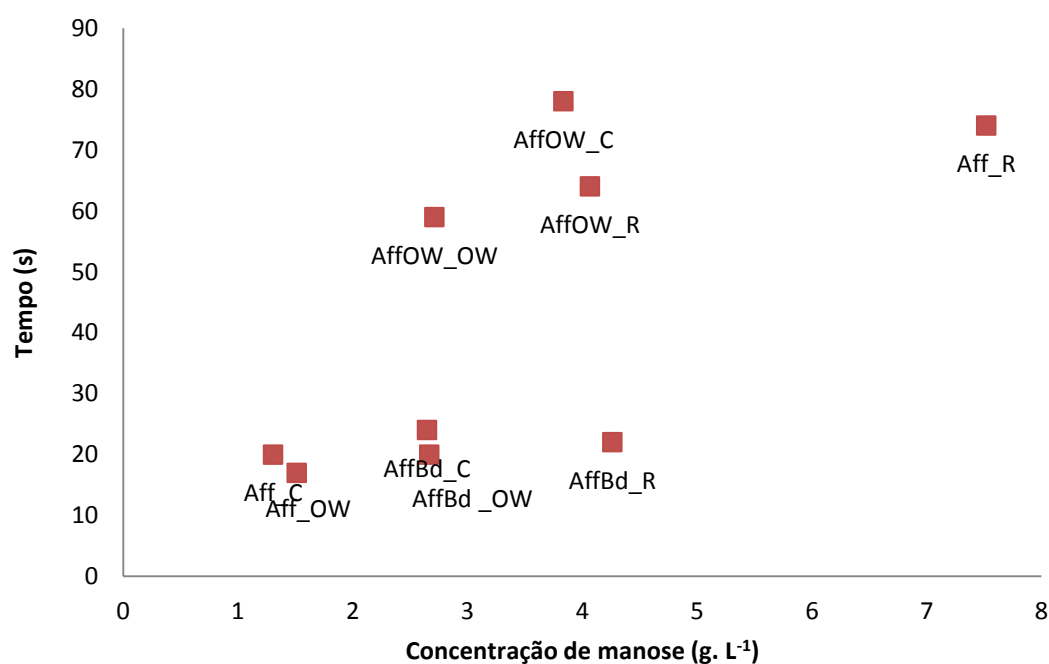
Os compostos fenólicos também têm sido relacionados com as propriedades dos espumantes. A formação de ligações de hidrogénio entre os grupos hidroxilo dos compostos fenólicos e a zona polar das proteínas pode ser relevante para a interação da interfase ar / líquido com o filme da bolha [107]. Os aminoácidos são outro grupo de moléculas que afetam a espuma. Estudos realizados demonstraram que os aminoácidos, glicina,  $\beta$ -alanina, e metionina apresentaram a maior correlação com HM [46]. No valor de pH do vinho, os aminoácidos encontram-se na forma protonada, atuando como agentes tensioativos catiónicos devido à hidrofobicidade das suas cadeias laterais. O carácter anfifílico dos aminoácidos pode fazer com que este se concentre na interface líquido-gás, melhorando a capacidade de espuma, essencialmente por diminuir a drenagem dos mesmos [46].

A quantidade total de manoproteínas dos vinhos também tem sido relacionada positivamente com o valor TS, estando essa representação apresentada na Figura 21 [108]. Segundo a Tabela 4 e o gráfico da Figura 19, os valores mais elevados de polissacarídeos totais correspondem aos vinhos com valores mais elevados de TS, com exceção do AffBd\_R, que apresentou elevado TS para uma concentração de polissacarídeos total mais baixa. Dentro dos polissacarídeos totais, as manoproteínas são uma das mais relevantes. Estes compostos podem contribuir para a formação das bolhas, por isso também contribui para os valores de HM. As manoproteínas apresentam um domínio hidrofóbico (proteico), que ficam expostos ao ar das bolhas e domínios hidrofílicos, como os açúcares (contendo resíduos de manose) que ficam expostos ao meio aquoso [105]. Logo, o TS também aumenta com o aumento da quantidade de manoproteínas. O Aff\_R foi o que apresentou uma maior concentração manoproteínas, com 8,13 g. L<sup>-1</sup> e o segundo valor de TS mais elevado, 74 s, apenas ligeiramente abaixo do valor máximo. A quantidade de manoproteínas presente nos vinhos não é o único responsável pela estabilidade da espuma. Existem sinergismos entre moléculas de baixo peso molecular e peptídeos de baixo peso molecular (200-300 Da). O polietileno glicol aumenta a solubilização dos agentes tensioativos e os compostos anfifílico podem reduzir as tensões superficiais e interfaciais por se acumularem na interface de líquidos imiscíveis, aumentando assim a estabilidade da espuma [18]. O vinho AffOW\_C apresentou o valor mais elevado de TS, 78 s, mas continha uma concentração de polissacarídeos de 4,65 g. L<sup>-1</sup>, pouco mais de metade de Aff\_R. O vinho AffOW\_C apresenta também menor percentagem de UA (1%) do que o vinho Aff\_R (4%), e uma menor presença de UA estão relacionados com o aumento de TS, podendo ser essa uma das razões pela qual, apesar da maior quantidade de polissacarídeos, apresentar um menor valor de TS [18].

## Avaliação do efeito da adição de vários produtos enológicos na espuma do vinho espumante



**Figura 20** - Relação entre a concentração de manoproteínas nos vinhos e a sua espumabilidade HM e HS (cm).



**Figura 21** - Relação entre a concentração de manoproteínas nos vinhos e a sua estabilidade TS (s).

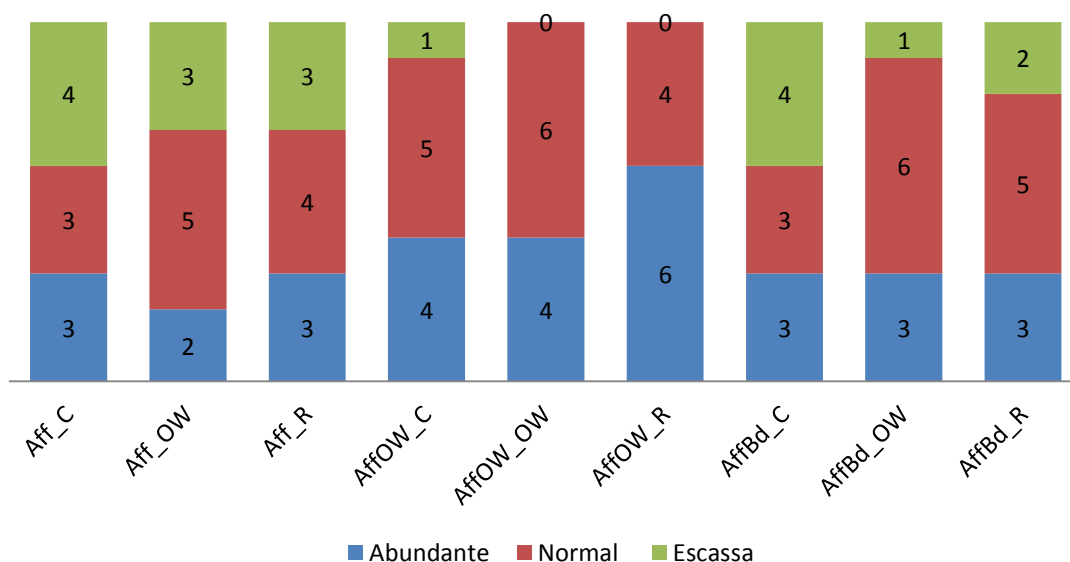
#### 4.6 - Análise sensorial

De forma a avaliar na globalidade as qualidades dos nove vinhos produzidos realizou-se uma análise sensorial descritiva e comparativa.

Os parâmetros quantidade e estabilidade da espuma, efervescência, e características descritivas dos vinhos, tais como o sabor, aroma e gosto foram avaliados por 10 provadores. A apreciação global dos vinhos foi também efetuada.

##### 4.6.1 - Quantidade de espuma

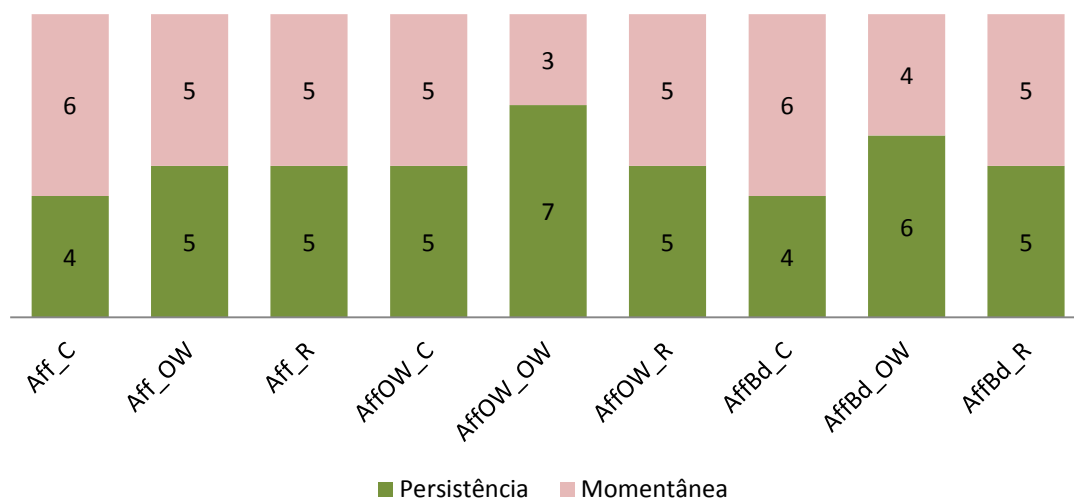
Pela representação gráfica da Figura 22, a avaliação dos provadores (pela maioria) indicou que o vinho AffOW\_R apresentava uma elevada quantidade de espuma, os vinhos Aff\_C e AffBd\_C apresentavam pouca quantidade de espuma, e os restantes vinhos uma quantidade de espuma normal. As avaliações de HM apresentadas na Figura 19 indicam que o AffOW\_R é um dos três vinhos com maior valor de HM, e os dois vinhos referidos como pouco abundantes em espuma encontram-se em conformidade com os valores de HM, sendo dos mais baixos.



**Figura 22** - Distribuição das respostas dos provadores sobre a quantidade de espuma.

#### 4.6.2 - Estabilidade da espuma

Quanto à estabilidade da espuma, as respostas dos provadores encontram-se distribuídas na representação gráfica da Figura 23. O vinho AffOW\_OW destacou-se pelo maior consenso de opiniões, com 7 provadores a considerarem que a bolha apresentou persistência na sua estabilidade. No entanto, os dados representados no gráfico da Figura 19 relativamente aos valores HM e TS deste vinho não se encontram em conformidade com a opinião dos provadores. Os vinhos Aff\_C e AffBd\_C foram considerados pouco persistentes, apresentando uma bolha momentânea. Estas análises dos provadores estão em sintonia com os resultados obtidos na leitura da medição de HM e TS da espuma. Contudo, a realização da prova organoléticas e a avaliação dos parâmetros foram realizados em condições de temperatura ambiente e de saturação, podendo este fator contribuir para alguma discrepância dos valores obtidos e das opiniões dos provadores.

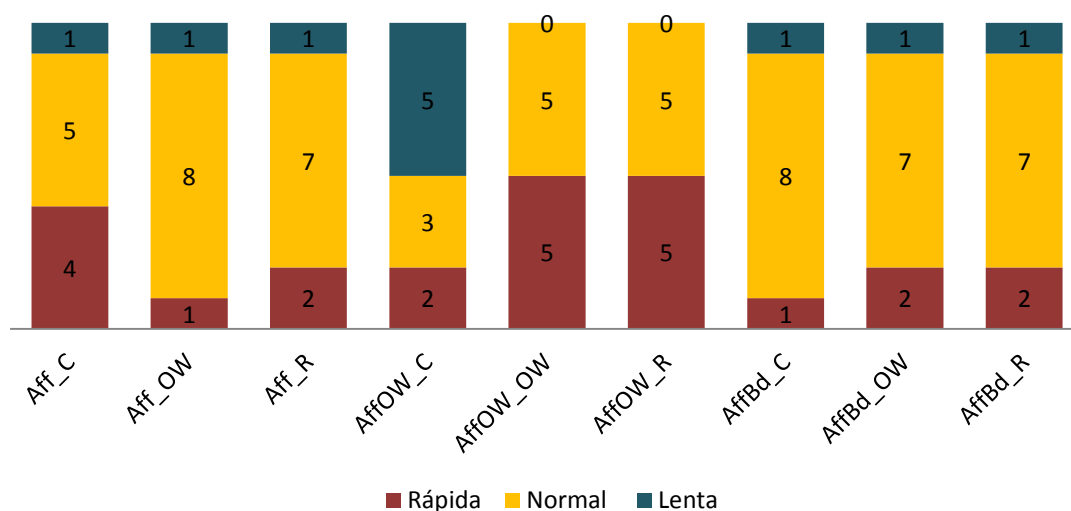


**Figura 23** - Distribuição das respostas do painel sobre o parâmetro estabilidade dos nove vinhos espumantes.



#### 4.6.3 - Efervescência das bolhas

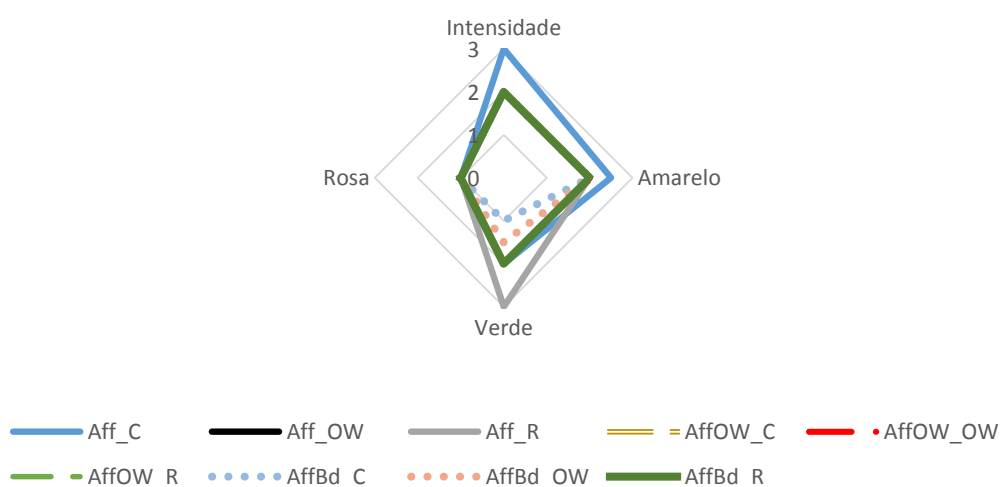
Nos espumantes, a efervescência consiste no desprendimento de dióxido de carbono do vinho espumante na forma de borbulha. Relativamente a este parâmetro, que se encontra representado graficamente pela Figura 24, verifica-se uma tendência das respostas dos provadores se aproximarem mais entre si. Os vinhos que foram considerados como tendo uma efervescência normal foram o Aff\_C; Aff\_OW; Aff\_R AffBd\_C; AffBd\_OW e AffBd\_R. O vinho AffOW\_C foi o único considerado com efervescência lenta. Os restantes dois vinhos, AffOW\_OW e AffOW\_R, obtiveram um empate nas respostas efervescência rápida e normal, não sendo assim possível tirar uma conclusão objetiva do seu tipo de efervescência. No entanto, ressalva-se o facto de estes terem sido os únicos vinhos a não obterem nenhuma resposta em efervescência lenta.



**Figura 24** - Distribuição das respostas do painel sobre o parâmetro efervescência dos nove vinhos espumante.

#### 4.6.4 - Cor dos vinhos espumantes

A avaliação dos provadores relativamente à cor (Figura 25) demonstrou que o vinho Aff\_C é o único que apresentou um destaque ao nível da intensidade do vinho e da cor amarela, com uma avaliação de 3 valores, num máximo de 6 para esses dois parâmetros relativos à cor do vinho. O vinho Aff\_R é o que apresentou, segundo o painel, uma tonalidade verde mais acentuada, tendo este também 3 valores em 6 nesse parâmetro.

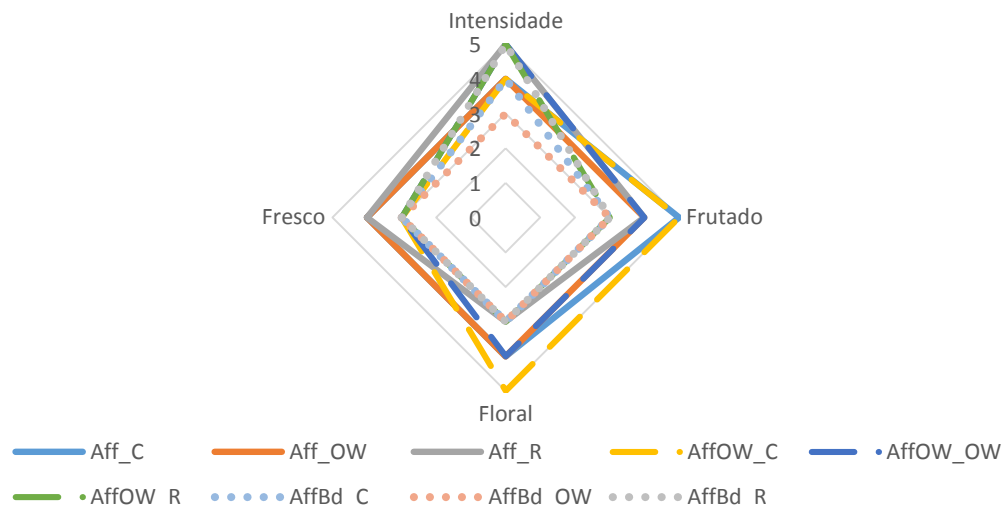


**Figura 25** - Avaliação da cor dos vinhos espumantes. Todas as médias observadas não diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,005$ ).

#### 4.6.5 - Aroma dos vinhos espumantes

O aroma é um dos parâmetros mais importantes na avaliação de um vinho. Na Figura 26, no nível de intensidade, os vinhos Aff\_R, AffOW\_OW, AffOW\_R e AffBd\_R são classificados com 5 valores em 6 possíveis. De notar que, com exceção do AffOW\_OW, todos os vinhos com mais cotação na intensidade realizaram a segunda fermentação na presença do Optimum Red®, sendo provavelmente este produto o responsável pelo aroma intenso dos vinhos. Já o AffBd\_OW foi o que obteve menor pontuação neste parâmetro (3). Os vinhos Aff\_C e AffOW\_OW foram considerados

frutados, sendo que o AffOW\_OW também foi considerado floral. Os vinhos considerados mais frescos foram os provenientes da primeira fermentação controlo.



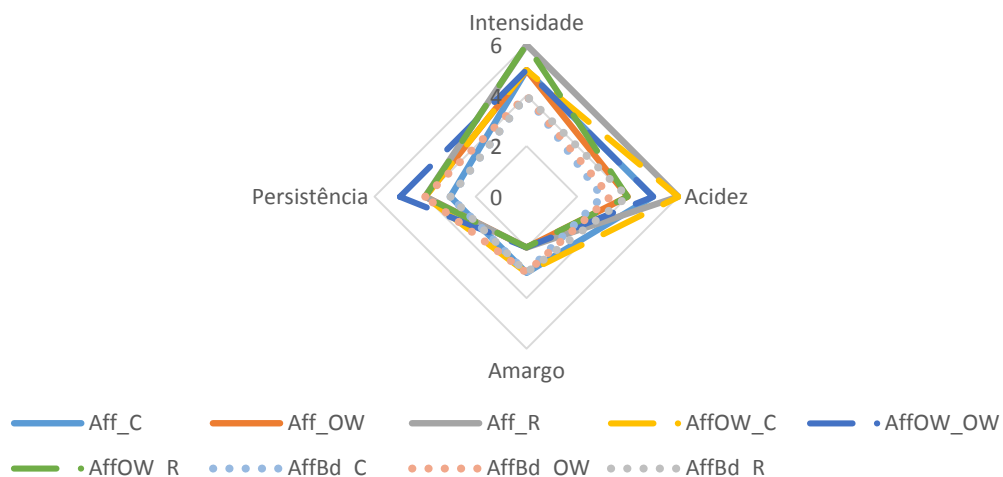
**Figura 26** - Avaliação do aroma do vinho espumante. Todas as médias observadas não diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,005$ ).

#### 4.6.6 - Gosto dos vinhos espumantes

O gosto (Figura 27) é também uma das qualidades de um vinho mais importantes e em conta pelos consumidores. Em relação à intensidade do gosto, os vinhos Aff\_R e AffOW\_R obtiveram nota máxima (6 valores). Em comum têm a adição do OptiRED na segunda fermentação, estando a este produto associado o aumento da perceção de boca, sendo esta a possível justificação para os provadores considerarem que estes vinhos apresentavam nota máxima na intensidade do gosto. Já os vinhos base que fermentaram com duas leveduras diferentes apresentam o nível de intensidade mais baixo, mas ainda assim todos obtiveram 4 valores de pontuação. Os vinhos Aff\_R e AffOW\_C foram considerados ácidos, com 6 valores cada um, seguindo-se o Aff\_C e AffOW\_OW, com 5 valores. Já os menos ácidos foram provenientes de vinhos base fermentados com duas leveduras diferentes. O uso de leveduras não *Saccharomyces* durante a fermentação tem sido relacionado como aumento do conteúdo em glicerol e com a capacidade de desacidificar o mosto e vinhos [62]. Os vinhos considerados menos amargos foram os

## Avaliação do efeito da adição de vários produtos enológicos na espuma do vinho espumante

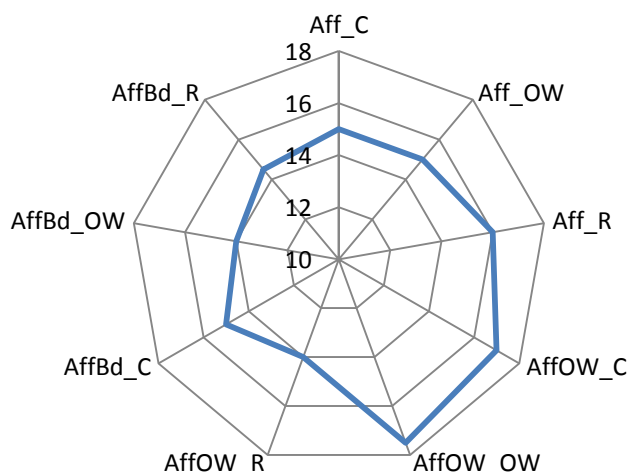
Aff\_OW, Aff\_R, AffOW\_OW e AffOW\_R, com 2 pontos cada. Todos os restantes foram avaliados com 3 pontos. Em relação à persistência do sabor, o vinho AffOW\_OW teve a avaliação mais elevada, 5 valores. As pontuações mais baixas foram atribuídas aos vinhos Aff\_C, AffBd\_C e AffBd\_R, sendo estas unânimes, com 3 valores para todos eles.



**Figura 27** - Avaliação do gosto do vinho espumante. Todas as médias observadas não diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,005$ ).

#### 4.6.7 - Apreciação global dos vinhos espumantes

A apreciação global dos vinhos foi realizada utilizando uma escala de 0-20. O resumo da avaliação encontra-se na Figura 28. O vinho que recebeu a nota de avaliação mais elevada foi o AffOW\_OW, com 17,5 valores, e logo de seguida o AffOW\_C, com 17. Em suma, estes dois vinhos apresentaram consenso nas opiniões dos provadores acerca da uma quantidade de espuma, que foi considerada normal. Já a avaliação da persistência na estabilidade da bolha, obteve opiniões díspares, tendo sido considerada lenta no vinho AffOW\_OW e considerada rápida no AffOW\_C. Estes dois vinhos também foram considerados pelos provadores como intensos, florados, frutados, mediantemente frescos e intensos a nível do aroma. Relativamente ao gosto, ambos foram considerados ácidos, pouco amargos e com elevada persistência de sabor. Estes resultados sugerem que a existência desta combinação de características enumeradas, nos vinhos espumantes, são as características gerais de apreciação dos consumidores.



**Figura 28** - Avaliação da apreciação global do vinho espumante. Todas as médias observadas não diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,005$ ).



## **5 - Conclusão**





## 5 - Conclusão

O propósito deste trabalho experimental apoiou-se essencialmente do interesse partilhado por parte das duas empresas envolvidas neste trabalho, Proenol Indústria Biotecnológica, Lda. e Aliança Vinhos de Portugal S.A. na produção de um vinho espumante com uma elevada qualidade de espuma, utilizando para isso produtos enológicos. Para além disso houve a necessidade de perceber como é que os produtos enológicos usados, conhecidos por terem elevado conteúdo em manoproteínas, contribuiriam para o melhoramento das propriedades e qualidade de espuma e de perceber em que fases seria mais vantajoso o uso dos produtos enológicos de modo a melhorar a espuma dos vinhos espumantes.

A avaliação destas questões revelou que a aplicação de produtos enológicos para a produção de espumantes tem interesses práticos. Foi possível observar que as diferentes combinações de produções resultam em produtos com propriedades de espuma diferentes e com características organoléticas diferentes.

O vinho AffOW\_C foi a modalidade produzida que apresentou valores mais elevados de HM, HS e TS. Este vinho teve a ação do Optimum White® durante a primeira fermentação, sem adição de nenhum produto durante a segunda. No entanto, com o vinho AffOW\_OW verificou-se que, conjugando os valores experimentalmente obtidos de espumabilidade e estabilidade da espuma com os resultados obtidos pela opinião dos provadores na análise sensorial, a aplicação do produto Optimum White® durante as duas fermentações é a opção mais vantajosa, já que este, apesar de não ser o vinho com os valores mais elevados de quantidade e estabilidade da espuma, foi considerado pelos provadores um vinho que apresenta uma boa quantidade de espuma, uma efervescência normal e elevada estabilidade. O referido vinho também demonstrou ter uma intensidade de aroma que agradava aos provadores, apresentando notas frutadas e florais, foi considerado ácido, no entanto não muito amargo, e apresentou uma persistência de gosto acentuada. Este vinho foi ainda o que obteve maior preferência global por parte dos provadores, obtendo uma avaliação de 17,5 valores em 20.

Em relação da quantidade de polissacarídeos, esta foi avaliada ao longo das várias fases da produção de espumantes. Foi verificado que a primeira fermentação com as duas leveduras (*S. cerevisia* e *T. delbruekii*) revelou-se muito promissora, tanto na quantidade como estabilidade da espuma. No entanto, após a segunda fermentação, as propriedades

positivas alcançadas durante a primeira fermentação perderam-se, não revelando apresentar grandes vantagens para o vinho espumante. Durante este trabalho foi verificado que o conteúdo em manoproteínas influencia a espumabilidade e estabilidade da espuma. As concentrações elevadas de manoproteínas, na ordem dos 2,7-4,1 g. L<sup>-1</sup>, apresentaram os melhores valores de HM e HS. Apesar de existir uma relação entre a quantidade de manoproteínas e os valores de HM e HS, a partir de valores de concentração superiores a 4,1 g. L<sup>-1</sup> não se verificou um incremento significativo nesses valores. Para o mesmo valor de concentração de manoproteínas, o valor de TS varia de 22 s para 78 s, não sendo a concentração de manoproteínas o único parâmetro diretamente relacionado com o aumento da estabilidade da espuma existindo outras moléculas químicas que se correlacionam, formando um sinergismo, e que influenciam a espuma. A interação entre as principais moléculas conhecidas como importantes para a espuma e a composição dos vinhos espumantes produzidos utilizando produtos enológicos seria um parâmetro importante a ser avaliado futuramente, de forma a perceber com mais pormenor as propriedades de espuma, como a sua formação e estabilidade. Isso permitiria eventualmente indicar eventuais combinações de fermentações que potencialmente teriam interesse para o melhoramento das propriedades de espuma.

## **6 - Bibliografia**



- [1] S. Buxaderas and E. López-Tamames, "Chapter 1 - Sparkling Wines: Features and Trends from Tradition," in *Advances in Food and Nutrition*, 66, Academic Press, 2012, 1–45.
- [2] A. V Carrascosa, A. Martinez-Rodriguez, E. Cebollero, and R. González, "Chapter 2 - *Saccharomyces* Yeasts II: Secondary Fermentation," in *Molecular Wine Microbiology*, Academic Press, 2011, 33–49.
- [3] P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, and A. Lonvaud, *Handbook of Enology, The microbiology of wine and vinifications*, 1. John Wiley & Sons, 2006.
- [4] F. Payne, J.B., Kevany, S., Matthaß, J., Ziliani, "A look at European sparkling wine production," *Wine Bus. Int.*, no. Global Sparkling Wine Production, 2008, 44–50.
- [5] C. Fischer and L. A. Gil-Alana, "The nature of the relationship between international tourism and international trade: the case of German imports of Spanish wine," *Appl. Econ.*, 41, 2009, 1345–1359.
- [6] R. S. Jackson, "9 - Specific and Distinctive Wine Styles," in *Wine Science*, 3<sup>a</sup> ed., Academic Press, 2008, 520–576.
- [7] R. S. Jackson, "7 - Fermentation," in *Wine Science*, 3<sup>a</sup> ed., Academic Press, 2008, 332–417.
- [8] A. V Carrascosa, R. Muñoz, and R. G. Garcia, " 2 - *Saccharomyces* Yeasts II: Secondary Fermentation" *Molecular wine microbiology*. Elsevier, 2011,34-47.
- [9] M. Valade and G. Blanck, "*Evolution des parametres analytiques au cours du pressurage en Champagne*," *Rev. Fr. d'Oenologie*, 1989.
- [10] A. Martínez-Rodríguez, A. V Carrascosa, J. M. Barcenilla, M. Angeles Pozo-Bayón, and M. Carmen Polo, "Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production," *Food Microbiol.*, 18, 2001, 183–191.
- [11] R. S. Jackson, "8 - Postfermentation Treatments and Related Topics," in *Wine Science*, 3<sup>a</sup> ed., Academic Press, 2008,. 418–519.
- [12] F. Gonçalves, C. Fernandes, P. C. dos Santos, and M. N. de Pinho, "Wine tartaric stabilization by electrodialysis and its assessment by the saturation temperature," *J. Food Eng.*, 59, 2003, 229–235.
- [13] M. D. Fumi, G. Trioli, M. G. Colombi, and O. Colagrande, "Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate gel and its application to bottle-fermented sparkling wine production," *Am. J. Enol. Vitic.*, 39, 1988, 267–272.
- [14] M. V. Moreno-Arribas and M. C. Polo, "7 - Carbohydrates", *Wine chemistry and biochemistry*, 378. Springer, 2009, 231-248.

- [15] G. Liger-Belair, “Visual Perception of Effervescence in *Champagne* and Other Sparkling Beverages,” *Adv. Food Nutr. Res.*, 61, 2010, 1–55.
- [16] S. Buxaderas and E. López-Tamames, *Managing the quality of sparkling wines*. Woodhead Publishing Limited, 2010.
- [17] E. Dickinson, “Colloidal aspects of beverages,” *Food Chem.*, 51, 4, 1994, 343–347.
- [18] E. Coelho, A. Reis, M. R. M. Domingues, S. M. Rocha, and M. A. Coimbra, “Synergistic effect of high and low molecular weight molecules in the foamability and foam stability of sparkling wines,” *J. Agric. Food Chem.*, 59, 2011, 3168–3179.
- [19] J. E. Kinsella, “Functional properties of proteins: possible relationships between structure and function in foams,” *Food Chem.*, 7, 1981, 273–288, 1981.
- [20] F. Brissonnet and A. Maujean, “Identification of some foam-active compounds in champagne base wines,” *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 1991, 97–102.
- [21] M. López-Barajas, A. Viu-Marco, E. López-Tamames, S. Buxaderas, and M. C. de la Torre-Boronat, “Foaming in grape juices of white varieties,” *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1997, 2526–2529.
- [22] V. Moreno-Arribas, E. Pueyo, F. J. Nieto, P. J. Martín-Álvarez, and M. C. Polo, “Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines,” *Food Chem.*, 70, 2000, 309–317.
- [23] E. Pueyo, P. J. Martín-Alvarez, and M. C. Polo, “Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cava (sparkling wines),” *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 1995, 518–524.
- [24] Y. P. Núñez, A. V Carrascosa, R. Gonzalez, M. C. Polo, and A. Martínez-Rodríguez, “Isolation and characterization of a thermally extracted yeast cell wall fraction potentially useful for improving the foaming properties of sparkling wines,” *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2006, 7898–7903.
- [25] A. Dussaud, G. B. Han, L. Ter Minassian-Saraga, and M. Vignes-Adler, “Surface properties of protein alcoholic solutions: I. Surface tension,” *J. Colloid Interface Sci.*, 167, 1994, 247–255.
- [26] M. Gallart, E. López-Tamames, G. Suberbiola, and S. Buxaderas, “Influence of fatty acids on wine foaming,” *J. Agric. Food Chem.*, 24, 2002, 7042–7045.
- [27] C. Betés-Saura, C. Andrés-Lacueva, and R. M. Lamuela-Raventós, “Phenolics in white free run juices and wines from Penedès by high-performance liquid chromatography: changes during vinification,” *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1996, 3040–3046.

- [28] M. A. Pozo-Bayón, E. Pueyo, P. J. Martín-Álvarez, A. J. Martínez-Rodríguez, and M. C. Polo, "Influence of yeast strain, bentonite addition, and aging time on volatile compounds of sparkling wines," *Am. J. Enol. Vitic.*, 2003, 273–278.
- [29] A. D. Jordan and D. H. Napper, "Some aspect of the physical chemistry of bubble and foam phenomena in sparkling wine," in *Sixth Australian Wine Industry Conference*, 1994, pp. 237–246.
- [30] A. Maujean, "*Histoire des Bulles*," *Rev. Français Oenol.*, 120, 1989, 11–17.
- [31] J. Casey, "Effervescence in sparkling wines: the sequel," *Aust. Grapegrow. Winemak.*, 1995.
- [32] J. A. Casey, "Bubble size, bubble frequency and rate of gas loss in sparkling wines," *Aust. Grapegrow. Winemak.*, 295, 1988, 19–22.
- [33] G. Liger-Belair, F. Beaumont, M.-A. Vialatte, S. Jégou, P. Jeandet, and G. Polidori, "Kinetics and stability of the mixing flow patterns found in *Champagne* glasses as determined by laser tomography techniques: Likely impact on Champagne tasting," *Anal. Chim. Acta*, 621, 2008, 30–37.
- [34] E. V. M. Coelho, "Relação do aroma e da espuma dos vinhos espumantes com o potencial enológico das uvas e dos vinhos," *Universidade de Aveiro*, Aveiro, Portugal, 2010.
- [35] C. Cilindre, G. Liger-Belair, S. Villaume, P. Jeandet, and R. Marchal, "Foaming properties of various *Champagne* wines depending on several parameters: grape variety, aging, protein and CO<sub>2</sub> content," *Anal. Chim. Acta*, 660, 2010, 164–170.
- [36] J. Torrens, M. Riu-Aumatell, S. Vichi, E. López-Tamames, and S. Buxaderas, "Assessment of volatile and sensory profiles between base and sparkling wines," *J. Agric. Food Chem.*, 58, 2010, 2455–2461.
- [37] M. Esteruelas, E. Gonzalez-Royo, N. Kontoudakis, A. Orte, A. Cantos, J. M. Canals, and F. Zamora, "Influence of grape maturity on the foaming properties of base wines and sparkling wines (Cava)," *J. Sci. Food Agric.*, 2014.
- [38] R. S. Jackson, "6 - Chemical Constituents of Grapes and Wine," in *Wine Science*, 4<sup>a</sup> ed., Academic Press, 2014, 347–426.
- [39] P. Pellerin, S. Vidal, P. Williams, and J. M. Brillouet, "Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content," *Carbohydr. Res.*, 277, 1995, 135–143.
- [40] P. Pellerin, T. Doco, S. Vida, P. Williams, J.-M. Brillouet, and M. A. O'Neill, "Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II," *Carbohydr. Res.*, 290, 1996, 183–197.

- [41] A. Rodrigues, J. M. Ricardo-Da-Silva, C. Lucas, and O. Laureano, "Effect of commercial mannoproteins on wine colour and tannins stability," *Food Chem.*, 131, 2012, 907–914.
- [42] R. Llaubères, D. Dubourdieu, and J. Villettaz, "Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in wine," *J. Sci. Food Agric.*, 41, 1987, 277–286.
- [43] C. Charpentier, "6 - Ageing on lees (*sur lies*) and the use of speciality inactive yeasts during wine fermentation," in *Food Science, Technology and Nutrition*, Woodhead Publishing, 2010, 164–187.
- [44] P. W. J. De Groot, A. F. Ram, and F. M. Klis, "Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls," *Fungal Genet. Biol.*, 42, 2005, 657–675.
- [45] S. Torresi, M. T. Frangipane, and G. Anelli, "Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review," *Food Chem.*, 129, 2011, 1232–1241.
- [46] L. Martínez-Lapuente, Z. Guadalupe, B. Ayestarán, and S. Pérez-Magariño, "Role of major wine constituents in the foam properties of white and rosé sparkling wines," *Food Chem*, 174, 2015, 330–338.
- [47] C. Charpentier, T. N. Van Long, R. Bonaly, and M. Feuillat, "Alteration of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 1986, 405–413.
- [48] M. Á. Pozo-Bayón, A. Martínez-Rodríguez, E. Pueyo, and M. Moreno-Arribas, "Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology," *Trends food Sci. Technol.*, 20, 2009, 289–299.
- [49] F. Gonçalves, A. Heyraud, M. N. de Pinho, and M. Rinaudo, "Characterization of White Wine Mannoproteins," *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2002, 6097–6101.
- [50] I. Corbacho, I. Olivero, and L. M. Hernández, "A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides," *Fungal Genet. Biol.*, 42, 2005, 773–790.
- [51] H. Alexandre, "2.45 - Autolysis of Yeasts," Academic Press, 2011, 641–649.
- [52] E. Coelho, M. A. Coimbra, J. M. F. Nogueira, and S. M. Rocha, "Quantification approach for assessment of sparkling wine volatiles from different soils, ripening stages, and varieties by stir bar sorptive extraction with liquid desorption," *Anal. Chim. Acta*, 635, 2009, 214–221.
- [53] H. Alexandre and M. Guillox-Benatier, "Yeast autolysis in sparkling wine - a review," *Aust. J. Grape Wine Res.*, 12, 2006, 119–127.



- [54] P. Comuzzo, L. Tat, A. Tonizzo, and F. Battistutta, "Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: Release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility," *Food Chem.*, 99, 2006, 217–230.
- [55] J. A. Pérez-Serradilla and M. D. de Castro, "Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract," *Food Chem.*, 124, 2011, 1652–1659.
- [56] J. H. Swiegers and I. S. Pretorius, "Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74, 2007, 954–960.
- [57] Y. Kourkoutas, V. Manojlović, and V. A. Nedović, "Immobilization of microbial cells for alcoholic and malolactic fermentation of wine and cider," in *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*, Springer, 2010, 327–343.
- [58] F. Coloretti, C. Zambonelli, and V. Tini, "Characterization of flocculent *Saccharomyces* interspecific hybrids for the production of sparkling wines," *Food Microbiol.*, 23, 2006, 672–676.
- [59] E. Cebollero and R. Gonzalez, "Autophagy: from basic research to its application in food biotechnology," *Biotechnol. Adv.*, 25, 2007, 396–409.
- [60] G. Giovani and I. Rosi, "Release of cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* thermosensitive autolytic mutants during alcoholic fermentation," *Int. J. Food Microbiol.*, 116, 19–24, 2007.
- [61] F. Comelles, J. J. Castro, and M. P. Bosch, "Aspecto físico-químicos relacionados con la capacidad espumante de diversas variedades de uva," *Aliment. equipos y Tecnol.*, 10, 1991, 87–98.
- [62] P. Domizio, Y. Liu, L. F. Bisson, and D. Barile, "Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine," *Food Microbiol.*, 43, 2014, 5–15.
- [63] D. Gonzalez-Ramos and R. Gonzalez, "Genetic determinants of the release of mannoproteins of enological interest by *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2006, 9411–9416.
- [64] D. Gonzalez-Ramos, E. Cebollero, and R. Gonzalez, "A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze," *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 2008, 5533–5540.
- [65] P. Domizio, C. Romani, F. Comitini, M. Gobbi, L. Lencioni, I. Mannazzu, and M. Ciani, "Potential spoilage non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*," *Ann. Microbiol.*, 61, 2011, 137–144.

- [66] M. Quirós, D. Gonzalez-Ramos, L. Tabera, and R. Gonzalez, "A new methodology to obtain wine yeast strains overproducing mannoproteins," *Int. J. Food Microbiol.*, 139, 2010, 9–14.
- [67] M. Juega, D. Gonzalez-Ramos, B. Bartolome, A. V Carrascosa, and A. J. Martinez-Rodriguez, "Chemical evaluation of white wines elaborated with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins," *Food Chem.*, 147, 2014, 84–91.
- [68] M. Ángeles Pozo-Bayón, I. Andújar-Ortiz, and M. V. Moreno-Arribas, "Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking," *Food Res. Int.*, 42, 2009, 754–761.
- [69] Y. Vasserot, S. Caillet, and A. Maujean, "Study of anthocyanin adsorption by yeast lees. Effect of some physicochemical parameters," *Am. J. Enol. Vitic.*, 48, 1997, 433–437.
- [70] C. Fornairon, J. P. Mazauric, J. M. Salmon, and M. Moutounet, "Observations on the oxygen consumption during maturation of wines on lees," *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin*, 1999.
- [71] J.-M. Salmon, C. Fornairon-Bonnefond, J.-P. Mazauric, and M. Moutounet, "Oxygen consumption by wine lees: impact on lees integrity during wine ageing," *Food Chem.*, 71, 2000, 519–528.
- [72] V. Soubeyrand, V. Luparia, P. Williams, T. Doco, A. Vernhet, A. Ortiz-Julien, and J.-M. Salmon, "Formation of micella containing solubilized sterols during rehydration of active dry yeasts improves their fermenting capacity," *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2005, 8025–8032.
- [73] L. Neto and A. A. Mendes-Ferreira, "*Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica*," *Food Sci. Technol.*, 25, 2005, 275–278.
- [74] S. Escot, M. Feuillat, L. Dulau, and C. Charpentier, "Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency," *Aust. J. Grape Wine Res.*, 7, 2001, 153–159.
- [75] S. Lafon-Lafourcade, C. Geneix, and P. Ribéreau-Gayon, "Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts," *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1984, 1246–1249.
- [76] M. J. Torija, N. Rozes, M. Poblet, J. M. Guillamón, and A. Mas, "Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*," *Int. J. Food Microbiol.*, 80, 2003, 47–53.
- [77] M. Feuillat and J. Guerreau, "*Les nouveaux activateurs de la fermentation alcoolique*," *Bull. l'OIV*, 69, 1996, 987–998.

- [78] M. A. Hoyt, L. Totis, and B. T. Roberts, “*S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function,” *Cell*, 66, 1991, 507–517.
- [79] E. C. Kritzing, F. F. Bauer, and W. J. du Toit, “Role of Glutathione in Winemaking: A Review,” *J. Agric. Food Chem.*, 61, 2, 2013, 269–277.
- [80] L. Moio, M. Ugliano, A. Genovese, A. Gambuti, R. Pessina, and P. Piombino, “Effect of antioxidant protection of must on volatile compounds and aroma shelf life of Falanghina (*Vitis vinifera* L.) wine,” *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2004, 891–897.
- [81] S. M. Rocha, P. Coutinho, I. Delgadillo, and M. A. Coimbra, “Headspace-solid phase microextraction–gas chromatography as a tool to define an index that establishes the retention capacity of the wine polymeric fraction towards ethyl esters,” *J. Chromatogr. A*, 1150, 2007, 155–161.
- [82] M. Berovic, M. Berlot, S. Kralj, and D. Makovec, “A new method for the rapid separation of magnetized yeast in sparkling wine,” *Biochem. Eng. J.*, 88, 2014, 77–84.
- [83] C. Zambonelli, “*Le caratteristiche enologiche dei lieviti. Le modalità di sviluppo nei mezzi liquidi*,” *Microbiol. e Biotecnol. dei vini. I Process. Biol. e le Tecnol. della Vinif.*, 2006, 144–151.
- [84] K. Yokotsuka, M. Yajima, and T. Matsudo, “Production of bottle-fermented sparkling wine using yeast immobilized in double-layer gel beads or strands,” *Am. J. Enol. Vitic.*, 48, 1997, 471–481.
- [85] R.-M. Canal-Llaubères, “4 - Enzymes and wine quality,” in *Food Science, Technology and Nutrition*, Woodhead Publishing, 2010, 93–132.
- [86] R. M. Canal-Llaubères, “*Les enzymes industrielles dans la biotechnologie du vin*,” *Rev. des Oenologues*, 53, 1989, 17–22.
- [87] Q. Li, A. M. Coffman, and L.-K. Ju, “Development of reproducible assays for polygalacturonase and pectinase,” *Enzyme Microb. Technol.*, 72, 2015, 42–48.
- [88] T. Doco, M. Lecas, P. Pellerin, J.-M. Brillouet, and M. Moutounet, “*Les polysaccharides pectiques de la pulpe et de la pellicule de raisin: quel devenir pendant la phase pré-fermentaire?*” *Rev. française d’oenologie*, 35, 1995, 16–23.
- [89] M. Feuillat, “Yeast macromolecules: origin, composition, and enological interest,” *Am. J. Enol. Vitic.*, 54, 2003, 211–213.
- [90] B. Ayestarán, Z. Guadalupe, and D. León, “Quantification of major grape polysaccharides (*Tempranillo* v.) released by maceration enzymes during the fermentation process,” *Anal. Chim. Acta*, 513, 2004, 29–39.

- [91] M.-A. Ducasse, “*Impact des enzymes de macération sur la composition en polysaccharides et en polyphénols des vins rouges: Etude en solutions modèle vin de l’évolution de ces composés.*” Montpellier ,2, 2009.
- [92] F. Palomero, A. Morata, S. Benito, M. C. González, and J. A. Suárez-Lepe, “Conventional and enzyme-assisted autolysis during ageing over lees in red wines: Influence on the release of polysaccharides from yeast cell walls and on wine monomeric anthocyanin content,” *Food Chem.*, 105, 2007, 838–846.
- [93] M. A. Coimbra, I. Delgadillo, K. W. Waldron, and R. R. Selvendran, “Isolation and analysis of cell wall polymers from olive pulp,” in *Plant cell wall analysis*, Springer, 1996, 19–44.
- [94] M. Bely, P. Stoeckle, I. Masneuf-Pomarède, and D. Dubourdieu, “Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation,” *Int. J. Food Microbiol.*, 122, 2008, 312–320.
- [95] J. J. Moreno, C. Millán, J. M. Ortega, and M. Medina, “Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures,” *J. Ind. Microbiol.*, 7, 1991, 181–189.,
- [96] M. Ciani, “Role, enological properties and potential use of non-*Saccharomyces* wine yeasts,” *Recent Res Dev Microbiol*, 1, 1997, 317–331.,
- [97] P. Renault, J. Coulon, G. de Revel, J.-C. Barbe, and M. Bely, “Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement,” *Int. J. Food Microbiol.*, 207, 2015, 40–48.
- [98] R. Del Barrio-Galán, S. Pérez-Magariño, M. Ortega-Heras, Z. Guadalupe, and B. Ayestarán, “Polysaccharide characterization of commercial dry yeast preparations and their effect on white and red wine composition,” *LWT-Food Sci. Technol.*, 48, 2012, 215–223.
- [99] S. S. Lin, J. K. Manchester, and J. I. Gordon, “Cellular glucose sensing, energy metabolism, and aging in *Saccharomyces cerevisiae*,” in *Energy Metabolism and Lifespan Determination*, l. 14, Elsevier, 2003, 197–213.
- [100] M. A. Coimbra, A. S. Barros, E. Coelho, F. Gonçalves, S. M. Rocha, and I. Delgadillo, “Quantification of polymeric mannose in wine extracts by FT-IR spectroscopy and OSC-PLS1 regression,” *Carbohydr. Polym.*, 61, 2005, 434–440.
- [101] J. C. Boulet, P. Williams, and T. Doco, “A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides,” *Carbohydr. Polym.*, 69, 2007, 79–85.
- [102] M. Ulbricht, W. Ansorge, I. Danielzik, M. König, and O. Schuster, “Fouling in microfiltration of wine: The influence of the membrane polymer on adsorption of polyphenols and polysaccharides,” *Sep. Purif. Technol.*, 68, 2009, 335–342.

- [103] J. Senée, B. Robillard, and M. Vignes-Adler, “The  $\zeta$ -potential of the endogenous particles of a wine of Champagne in relation to the foaming behaviour,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 21, 2001, 59–67.
- [104] A. Maujean, P. Poinsaut, H. Dantan, F. Brissonnet, and E. Cossiez, “*Etude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescents. II: Mise au point d’une technique de mesure de la moussabilité de la tenue et de la stabilité de la mousse des vins effervescents*,” *Bull. l’OIV*, 63, 1990, 711–712.
- [105] L. Blasco, M. Viñas, and T. G. Villa, “Proteins influencing foam formation in wine and beer: the role of yeast,” *Int. Microbiol.*, 14, 2011, 61–71.
- [106] C. Andrés-Lacueva, R. M. Lamuela-Raventós, S. Buxaderas, and M. del C. de la Torre-Boronat, “Influence of variety and aging on foaming properties of *Cava* (sparkling wine),” *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1997, 2520–2525.
- [107] P. Sausse, V. Aguié-Béghin, and R. Douillard, “Effects of epigallocatechin gallate on  $\beta$ -casein adsorption at the air/water interface,” *Langmuir*, 19, 2003, 737–743.
- [108] E. Coelho, S. M. Rocha, and M. A. Coimbra, “Foamability and foam stability of molecular reconstituted model sparkling wines,” *J. Agric. Food Chem.*, 59, 2011, 8770–8778.



## **7 - Anexos**





## ANEXO I

### VINIFICAÇÃO

Leveduras Inativas Específicas

**Optimum White®**

### Aplicações

**Optimum White®** é uma levedura enológica específica, inativada rica em glutatão (antioxidante) e polissacarídeos. É o resultado de um novo processo de produção otimizado, que melhora a biodisponibilidade do glutatão. Adicionado ao mosto na altura da inoculação, **Optimum White®** fornece protecção contra a oxidação. Em termos de qualidade aromática do vinho, **Optimum White®** melhora a preservação de tióis e ésteres após um ano de envelhecimento em garrafa. Devido à libertação de polissacarídeos, **Optimum White®** além de aumentar a redondez em boca também contribui para aumentar a complexidade do vinho.

### Resultados

Vários estudos e ensaios têm demonstrado o impacto positivo do glutatão na preservação de tióis após um ano de envelhecimento em garrafa. As diferenças entre o controlo e o tratamento com **Optimum White®** (adicionado no início da fermentação alcoólica em Sauvignon Blanc) são apresentadas na figura a seguir. O tratamento mostra uma melhor preservação do 3-mercaptopentanol (3MP) e do seu acetato (3MPA), que são responsáveis por aromas tais como maracujá e toranja.



**Ensaiio em Sauvignon Blanc: simulação rápida de envelhecimento oxidativo em vinho.** Protocolo Específico: O vinho fica em contacto com O<sub>2</sub> puro (meia garrafa) durante 350 horas, a 20°C. Acompanhamento da concentração de O<sub>2</sub> com PreSens (50mg/L após 350 horas de exposição)

**Limitares de percepção:**

- 3MPH : 50 a 60 ng/L
- 3MPA : 2,5 a 9 ng/L

### Dose de Aplicação

- Dose média recomendada: 20-40g/hL. Dependendo do resultado pretendido.

**Levedura inativa específica para aumentar a intensidade e longevidade aromática em vinhos brancos e rosés.**

### Modo de Utilização

- Diluir **Optimum White®** em 10 vezes o seu peso em água ou mosto e misturar.
- Adicionar ao mosto depois de prensar, no início da fermentação.
- **Optimum White®** também contribui com uma pequena dose de NFA para as leveduras. Não substitui no entanto o programa de nutrição normal.

### Embalagem

- 1kg.

### Armazenamento

- Armazenar em ambiente seco.

### Qualidade, Segurança-Ambiente

- Não contém Organismos Geneticamente Modificados, não foi produzido a partir dos mesmos e não inclui substâncias com origem nos referidos organismos.
- Não tratado por radiação ionizante.
- Não contém as substâncias alérgicas referidas na Directiva 2007/68/CE
- Está conforme os Regulamentos CE 479/2008 e 606/2009.
- Está conforme o Codex Enológico Internacional, versão em vigor.

*O fabricante garante a qualidade dos seus produtos vendidos na embalagem de origem. As informações contidas nos documentos são fundamentadas nos nossos conhecimentos a nível e no resultado de ensaios efectuados com grande preocupação de objectividade, a sua adopção a cada caso particular, assim como as consequências de circunstâncias de cada variação não comprometem a nossa responsabilidade.*



Travessa das Lagoas nº 267, Apartado 547 4405-194 Canelas, VNG  
T. 227 150 840 - F. 227 150 849 - [proenol@proenol.com](mailto:proenol@proenol.com) - [www.proenol.com](http://www.proenol.com)



FT414-01  
LAL20110629

Pág.1/1



ANEXO II



**LEVEL<sup>2</sup>**  
SOLUTIONS



**BIODIVA™**  
TD291

**APPLICATIONS**



**LEVEL<sup>2</sup>**  
SOLUTIONS

The wide variety of selected natural yeasts reflects the biodiversity, and yet this diversity is still underexploited despite the large number of species and subspecies (other than *Saccharomyces cerevisiae*) that are present in most grape musts. During spontaneous fermentation, actual microbial population dynamics result in successions of enzyme activity that undoubtedly contribute, positively or negatively, to the aromatic complexity and diversity of the wine. Thanks to Lallemant R&D research program, the management of alcoholic fermentation (AF) introducing the use of non-conventional selected yeasts such as *Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima* in sequential inoculation with *Saccharomyces cerevisiae* opens new possibilities for winemakers.

**TO ENHANCE AROMA & MOUTHFEEL COMPLEXITY**

Biodiva™ is a pure culture of *Torulaspora delbrueckii*, selected for its properties to enhance wine aromatic and mouthfeel complexity. Used in sequential inoculation with compatible selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast studied and recommended by Lallemant, Biodiva™ will help to control development of wines aromatic complexity by favoring the perception of certain esters without overwhelming the wines.

Due to its low volatile acidity production and its tolerance to osmotic shock, Biodiva™ is particularly adapted for fermenting late harvest and ice wines.

**TECHNICAL CHARACTERISTICS**

- Species: *Torulaspora delbrueckii*
- Lag phase: Moderate
- Alcohol tolerance: when used for fermenting high premium sweet wine, usage of yeast protectant such as Natstep® is recommended.
- Optimal fermentation temperature: >16°C/61°F
- Volatile acidity production: Very low
- Very good compatibility with malolactic fermentation
- Nitrogen needs:

YAN level (mg/L)	< 80	80 < YAN LEVEL < 150	> 150
<b>YAN – Yeast Assimilable Nitrogen</b>	1- Add complex nutrition* just after Biodiva™ Inoculation		
	2- Add complex nutrition* just after <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Inoculation	1- Add complex nutrition* just after <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Inoculation	1- Add complex nutrition* just after <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Inoculation
	3- Add DAP** after a drop of 45 points from original density	2- Add complex nutrition* after a drop of 45 points from original density	

\* For inoculation rate, follow good nutrition practices

\*\* Diammonium Phosphate



GO TO THE NEXT LEVEL

# LEVEL<sup>2</sup>

SOLUTIONS

# BIODIVA™

## TD291

**SENSORY PROFILE**

**Comparative trial on Syrah 2011 (Rhône valley): Impact of Biodiva™ on the sensory profile**  
Blind tasting, 27 tasters

Attribute	Biodiva™ + recommended <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A	Recommended <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A
Net fruit aroma	22	10
Dark fruit aroma	12	20
Alcyl	15	18
Global aromatic quality	20	15
Alcohol at	18	15
Structure	22	10
Body	22	10
Aromatic intensity	22	10
Global quality	18	15

**INSTRUCTIONS FOR USE**

**Cool Climate Oenology and Viticulture Institute (CCOVI), Brock University, Vidal Icewine Juice 2011**

Ascorbic acid concentration during icewine fermentation.

- *S. cerevisiae* 734
- Biodiva™ 0.2 g/L inoculation rate
- ◆ Biodiva™ 0.20 g/L inoculation rate

**TO BE USED IN SEQUENTIAL INOCULATION AS FOLLOWS**

**Important:**  
Before inoculation, make sure that the free SO<sub>2</sub> level is lower than 15 mg/L.

**1ST INOCULATION: BIODIVA™**  
Inoculate at 25 g/hL: rehydrate the yeast in 10 times its weight of water at 30°C/86°F. After 15 minutes, stir very gently.  
To help the yeast rehydrated acclimate to the cooler juice temperature and avoid cold shock, slowly combine an equal amount of juice with yeast Rehydration solution (this step may need to be repeated).  
Total rehydration time should not exceed 45 minutes.

**2ND INOCULATION: THE SACCHAROMYCES CEREVISIAE A**  
After a density drop of 10 to 15 points (1.5 to 3°Brix) from the starting juice density, proceed to the 2<sup>nd</sup> inoculation of the recommended selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast at 25 g/hL with standard *Saccharomyces cerevisiae* yeast rehydration protocol (clean water, 37°C/99°F, 20 to 30 minutes).

**For more information, please contact your Lallemand representative**

**PACKAGING AND STORAGE**

Available in 125 & 500 g pack.  
Store 24 months at 4°C/38°F, in original unopened packaging.

Lallemand S.A.S. - B.P. 59 - 31702 Blagnac Cedex - France / Tel : +33(0)5 62 74 55 55 / Fax : +33(0)5 62 74 55 00  
Lallemand Oenology: Natural solutions that add value to the world of winemaking / [www.lallemandwine.com](http://www.lallemandwine.com)

March 2013



## ANEXO III

FERMENTATION

FILTRATION

CORKS & PACKAGING

EQUIPMENT

LABORATORY



### LALLZYME MMX

*Clarification enzyme for Botrytis infected wines and for yeast lees maceration*

#### CHARACTERISTICS

Lallzyme MMX™ is a betaglucanase and pectinase blend sourced from *Trichoderma sp.* and *Aspergillus niger*. This enzyme preparation was developed to improve yeast autolysis of wine aged on yeast lees. Due to the synergistic actions of the glucanase and pectinase activities, Lallzyme MMX can improve the clarity and filterability of wines infected with *Botrytis*. This results in a rounder, fuller bodied wine.

Since the Betaglucanase portion of Lallzyme MMX is sourced from *Trichoderma sp.* it should be used in accordance with the TTB regulations set forth in 24.250.

#### RECOMMENDED DOSAGE

Application	Parameters (Temperature/Time)	Recommended Dosage
Red wines aging on lees	10-15°C (50-59°F)/ minimum 6 weeks	4-5 g/hL
White wines aging on lees	10-15°C (50-59°F)/ minimum 6 weeks	2-3 g/hL
Sparkling wines aging on lees (after 2 <sup>nd</sup> fermentation)	10-12°C (50-54°F)/ minimum 3 months	1 g/hL
Filtration of wines rich in glucans ( <i>Botrytis</i> infection)	10-15°C (50-59°F)/ minimum 6 weeks	2-3 g/hL

**DIRECTIONS FOR USE:** Dilute Lallzyme MMX in 10 times its weight in water, gently stir and allow to soak for a few minutes. Add diluted enzyme to wine and homogenize.

**STORAGE:** Dated expiration. Store dry enzymes at 25°C (77°F). Once rehydrated, use within a few hours.



Document Edited 06.11.13

2220 Pine View Way, Petaluma, CA 94954 • (707) 765-6666 • info@scottlab.com • www.scottlab.com



## ANEXO IV

### VINIFICAÇÃO

#### Leveduras Inativas Específicas

**OptiRED®**

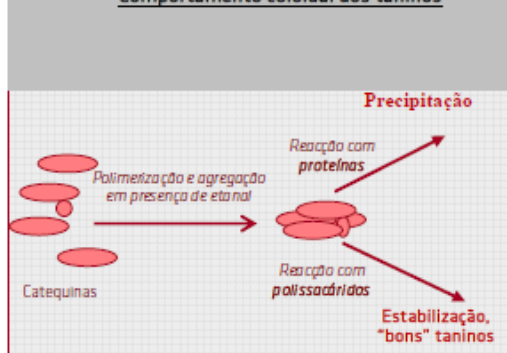
### Características

- **OptiRED®** é uma levedura enológica específica inactiva obtida por um processo específico, a fim de facilitar a libertação de polissacáridos celulares para o mosto.
- **OptiRED®** aumenta a quantidade de polissacáridos aptos a combinar os taninos reactivos, aumentando assim a redondez do mosto/vinho. **OptiRED®** permite uma estabilidade de matéria corante superior por reacção destas moléculas com as antocianinas.

#### A INTERACÇÃO DOS POLISSACÁRIDOS COM OS TANINOS

- Existem vários resultados práticos e científicos que demonstram que os polissacáridos reagem com os taninos do vinho.
- Segundo alguns autores (Saucier et al, 2000; Cheyner et al, 2000), quando pequenas moléculas de taninos estão presentes numa solução a uma concentração suficientemente elevada, interagem originando partículas coloidais com grande reactividade.
- Estes taninos facilmente se polimerizam e/ou ligam-se a proteínas, formando moléculas de elevado peso molecular que tendem a precipitar. A existência de polissacáridos no mosto evita esta situação.

#### Comportamento coloidal dos taninos



#### TANINOS MAIS ESTÁVEIS

- Os polissacáridos têm função de colóide protector: ao envolverem as moléculas de taninos, evitam a sua reacção com outras moléculas de taninos de elevado peso molecular, e, consequentemente, a sua precipitação.
- Portanto, na presença de polissacáridos, os polifenóis adquirem uma estabilidade acrescida ao longo do envelhecimento. Os vinhos com grande concentração de polissacáridos registam uma menor diminuição da cor antes do engarrafamento e durante o armazenamento.

#### TANINOS MAIS "REDONDOS"

- Ainda que os mecanismos moleculares deste fenómeno não estejam completamente descodificados, todos os enólogos estão de acordo ao atribuir aos polissacáridos um efeito positivo sobre a percepção dos taninos em boca. Aparentemente, eles envolvem as moléculas de taninos, diminuindo a sua reactividade com as proteínas da saliva, que se traduz por uma redução da percepção de adstringência na prova.

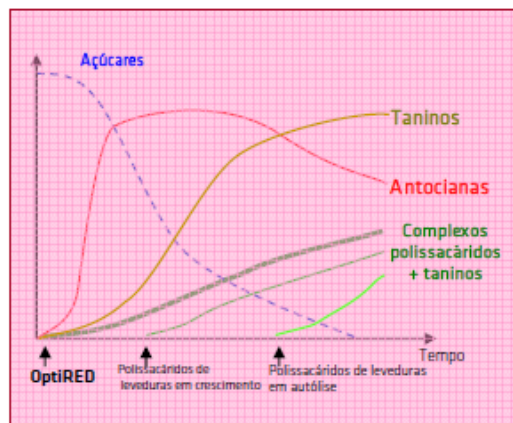
### Levedura inactiva para a produção de Vinho Tinto de qualidade

#### POLISSACÁRIDOS DA LEVEDURA E DA UVA

- A família dos polissacáridos naturais dos vinhos inclui os que provêm da uva e os de origem microbiológica: cada tipo tem uma reactividade diferente com os taninos e um efeito relativo específico sobre as características sensoriais e a estabilidade do vinho. Os polissacáridos da levedura são particularmente reactivos com os polifenóis. Foi demonstrado que estes compostos podem reduzir de forma significativa os índices de adstringência e aumentam a sensação de "bons" taninos do vinho. É igualmente reconhecido que os polissacáridos de levedura produzidos durante a fase de crescimento exponencial da fermentação são bastante mais reactivos que os libertados durante a autólise (Escol et al, 2000).

#### O CONCEITO OPTIRED

- Os complexos taninos-polissacáridos são positivos para a qualidade do vinho e, de entre os polissacarídeos do vinho, os que provêm da levedura são os mais eficazes.
- Normalmente, a formação de complexos taninos-polissacarídeos começa no final da Fermentação Alcoólica (F.A.), quando as leveduras entram em autólise.
- Uma maceração longa permite um maior desenvolvimento destes complexos e, por esta razão, esta técnica tem-se tornado cada vez mais popular para a produção de vinhos tintos de qualidade.
- Uma maneira de reforçar o efeito positivo da levedura sobre os taninos é de utilizar uma levedura produtora de polissacáridos durante a F.A., que vai aumentar o conteúdo final em complexos taninos - polissacáridos.



- O **OptiRED®** representa um desenvolvimento deste conceito na vinificação. É adicionado ao mosto no início da F.A. e o rápido aumento do conteúdo em polissacáridos no mosto permite, precocemente, uma reacção com os taninos presentes no meio.
- O **OptiRED®** é obtido a partir da biomassa de uma levedura particularmente rica em polissacáridos recolhida no fim da fase de crescimento. Estes polissacáridos são mais reactivos que os libertados durante a autólise. O efeito final é uma maior concentração de complexos taninos/ polissacáridos.



## VINIFICAÇÃO

### Leveduras Inactivas Específicas

OptiRED®

- O processo de produção do **OptiRED®** inclui um tratamento enzimático que facilita a libertação dos polissacarídeos no mosto ou vinho.

#### FUNÇÃO DE NUTRIENTE PARA LEVEDURAS

- **OptiRED®** é constituído por uma levedura inactiva. Cede ao meio aminoácidos, vitaminas e factores de sobrevivência, que contribuem positivamente para a nutrição das leveduras. No entanto as doses de azoto facilmente assimilável incorporadas são reduzidas pelo que devem ser sempre complementadas com outros nutrientes.

## Dose de Aplicação

- A dose recomendada de **OptiRED®** é de 30g por 100Kg de uvas.
- Em vinho, recomendamos a dose máxima de 30g/hL. É conveniente realizar ensaios prévios para definir a dose a aplicar.

## Modo de Utilização

- **OptiRED®** deve ser dissolvido e adicionado directamente ao volume final de mosto ou vinho. No caso de ser usado em mosto, deve ser aplicado no início da fermentação alcoólica.

## Embalagem

- Sacos de 2,5 Kg

## Armazenamento

- Quando guardado a 25°C ou mesmo a temperaturas inferiores em embalagem fechada, **OptiRED®** mantém a sua actividade durante pelo menos 3 anos. Evitar humidade e a exposição a altas temperaturas.

## Qualidade, Segurança - Ambiente

- Não contém Organismos Geneticamente Modificados, não foi produzido a partir dos mesmos e não inclui substâncias com origem nos referidos organismos.
- Não tratado por radiação ionizante.
- Não contém as substâncias alérgicas referidas na Directiva 2007/68/CE.
- Está conforme o Codex Enológico Internacional, versão em vigor.

*O fabricante garante a qualidade dos seus produtos vendidos na embalagem de origem. As informações contidas nos documentos são fundamentadas nas suas conhecimentos actuais e no resultado de ensaios efectuados com grande preocupação de objectividade; a sua adopção a cada caso particular, assim como as consequências de circunstâncias de cada tratamento não comprometem a nossa responsabilidade.*



Travessa das Lages nº 267, Apartado 547 4405-194 Canelas, VNG  
T. 227 150 840 - F. 227 150 849 - [proenol@proenol.com](mailto:proenol@proenol.com) - [www.proenol.com](http://www.proenol.com)



FT049-08  
LAL20091001

Pág. 2/2



## ANEXO V

OIV-MA-AS2-01A: R2009

11

Table II  
Temperature corrections  $c$ , required for the density of dry wines and dry alcohol free wines,  
measured in a Pyrex-glass pycnometer at  $t^{\circ}\text{C}$ , in order to correct to  $20^{\circ}\text{C}$   
 $\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$  - si  $t^{\circ}$  est inférieure à  $20^{\circ}\text{C}$   
+ si  $t^{\circ}$  est supérieure à  $20^{\circ}\text{C}$

		Alcoholic strength																										
		0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27			
Temperatures in °C	10°	1,59	1,64	1,67	1,71	1,77	1,84	1,91	2,01	2,11	2,22	2,34	2,46	2,60	2,73	2,88	3,03	3,19	3,35	3,52	3,70	3,87	4,06	4,25	4,44			
	11°	1,48	1,53	1,56	1,60	1,64	1,70	1,77	1,86	1,95	2,05	2,16	2,27	2,38	2,51	2,63	2,77	2,91	3,06	3,21	3,36	3,53	3,69	3,86	4,03			
	12°	1,36	1,40	1,43	1,46	1,50	1,56	1,62	1,69	1,78	1,86	1,96	2,05	2,16	2,27	2,38	2,50	2,62	2,75	2,88	3,02	3,16	3,31	3,46	3,61			
	13°	1,22	1,26	1,28	1,32	1,35	1,40	1,45	1,52	1,59	1,67	1,75	1,83	1,92	2,01	2,11	2,22	2,32	2,44	2,55	2,67	2,79	2,92	3,05	3,18			
	14°	1,08	1,11	1,13	1,16	1,19	1,23	1,27	1,33	1,39	1,46	1,52	1,60	1,67	1,75	1,94	1,93	2,03	2,11	2,21	2,31	2,42	2,52	2,63	2,74			
	15°	0,92	0,96	0,97	0,99	1,02	1,05	1,09	1,13	1,19	1,24	1,30	1,36	1,42	1,48	1,55	1,63	1,70	1,78	1,86	1,95	2,03	2,12	2,21	2,30			
	16°	0,76	0,79	0,80	0,81	0,94	0,86	0,89	0,93	0,97	1,01	1,06	1,10	1,16	1,21	1,26	1,32	1,38	1,44	1,51	1,57	1,64	1,71	1,78	1,85			
	17°	0,59	0,61	0,62	0,63	0,65	0,67	0,69	0,72	0,75	0,78	0,81	0,85	0,88	0,95	0,96	1,01	1,05	1,11	1,15	1,20	1,25	1,30	1,35	1,40			
	18°	0,40	0,42	0,42	0,43	0,44	0,46	0,47	0,49	0,51	0,53	0,55	0,57	0,60	0,63	0,65	0,68	0,71	0,74	0,77	0,81	0,84	0,87	0,91	0,94			
	19°	0,21	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,32	0,33	0,34	0,36	0,37	0,39	0,41	0,42	0,44	0,46	0,47			
	20°																											
	21°	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,31	0,32	0,34	0,36	0,37	0,38	0,40	0,41	0,43	0,44	0,46	0,48			
	22°	0,44	0,45	0,46	0,47	0,48	0,49	0,51	0,52	0,54	0,56	0,59	0,61	0,63	0,66	0,69	0,71	0,74	0,77	0,80	0,83	0,87	0,90	0,93	0,97			
	23°	0,68	0,70	0,71	0,72	0,74	0,76	0,78	0,80	0,83	0,86	0,90	0,93	0,96	1,00	1,03	1,08	1,13	1,17	1,22	1,26	1,31	1,37	1,41	1,46			
	24°	0,93	0,96	0,97	0,99	1,01	1,03	1,06	1,10	1,13	1,18	1,22	1,26	1,31	1,36	1,41	1,47	1,52	1,58	1,64	1,71	1,77	1,84	1,90	1,97			
25°	1,19	1,23	1,25	1,27	1,29	1,32	1,36	1,40	1,45	1,50	1,55	1,61	1,67	1,73	1,80	1,86	1,93	2,00	2,08	2,16	2,24	2,32	2,40	2,48				
26°	1,47	1,51	1,53	1,56	1,59	1,62	1,67	1,72	1,77	1,83	1,90	1,96	2,03	2,11	2,19	2,27	2,35	2,44	2,53	2,62	2,72	2,81	2,91	3,01				
27°	1,75	1,80	1,82	1,85	1,89	1,93	1,98	2,04	2,11	2,18	2,25	2,33	2,41	2,50	2,59	2,68	2,78	2,88	2,98	3,09	3,20	3,31	3,42	3,53				
28°	2,04	2,10	2,13	2,16	2,20	2,25	2,31	2,38	2,45	2,53	2,62	2,70	2,80	2,89	3,00	3,10	3,21	3,32	3,45	3,57	3,69	3,82	3,94	4,07				
29°	2,34	2,41	2,44	2,48	2,53	2,58	2,65	2,72	2,81	2,89	2,99	3,09	3,19	3,30	3,42	3,53	3,65	3,78	3,92	4,05	4,19	4,33	4,47	4,61				
30°	2,66	2,73	2,77	2,81	2,86	2,92	3,00	3,08	3,17	3,27	3,37	3,48	3,59	3,72	3,84	3,97	4,11	4,25	4,40	4,55	4,70	4,85	4,92	5,17				

Note: This table can be used to convert  $d_{20}^{11}$  to  $d_{20}^{30}$

COMPENDIUM OF INTERNATIONAL ANALYSIS OF METHODS-OIV  
Alcoholic strength by volume

OIV-MA-AS2-01A: R2009

12

Table III  
Temperature corrections  $c$  required for the density of natural or concentrated musts  
as measured in a Pyrex-glass pycnometer at  $t^{\circ}\text{C}$  to correct to  $20^{\circ}\text{C}$ .  
 $\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$  - if  $t^{\circ}$  is less than  $20^{\circ}\text{C}$   
+ if  $t^{\circ}$  is more than  $20^{\circ}\text{C}$

		Density																											
		1,05	1,06	1,07	1,08	1,09	1,10	1,11	1,12	1,13	1,14	1,15	1,16	1,18	1,20	1,22	1,24	1,26	1,28	1,30	1,32	1,34	1,36						
Temperatures in °C	10°	2,31	2,48	2,66	2,82	2,99	3,13	3,30	3,44	3,59	3,73	3,88	4,01	4,28	4,52	4,76	4,98	5,18	5,42	5,56	5,73	5,90	6,05						
	11°	2,12	2,28	2,42	2,57	2,72	2,86	2,99	3,12	3,25	3,37	3,50	3,62	3,85	4,08	4,29	4,48	4,67	4,84	5,00	5,16	5,31	5,45						
	12°	1,92	2,06	2,19	2,32	2,45	2,58	2,70	2,92	2,94	3,04	3,15	3,26	3,47	3,67	3,85	4,03	4,20	4,36	4,51	4,65	4,78	4,91						
	13°	1,72	1,84	1,95	2,06	2,17	2,27	2,38	2,48	2,58	2,69	2,78	2,89	3,05	3,22	3,39	3,55	3,65	3,84	3,98	4,11	4,24	4,36						
	14°	1,52	1,62	1,72	1,81	1,90	2,00	2,09	2,17	2,26	2,34	2,43	2,51	2,66	2,82	2,96	3,09	3,22	3,34	3,45	3,56	3,67	3,76						
	15°	1,28	1,36	1,44	1,52	1,60	1,67	1,75	1,82	1,89	1,96	2,04	2,11	2,24	2,36	2,48	2,59	2,69	2,79	2,88	2,97	3,03	3,10						
	16°	1,05	1,12	1,18	1,25	1,31	1,37	1,43	1,49	1,55	1,60	1,66	1,71	1,81	1,90	2,00	2,08	2,16	2,24	2,30	2,37	2,43	2,49						
	17°	0,80	0,86	0,90	0,95	1,00	1,04	1,09	1,13	1,18	1,22	1,26	1,30	1,37	1,44	1,51	1,57	1,62	1,68	1,72	1,76	1,80	1,84						
	18°	0,56	0,59	0,62	0,66	0,68	0,72	0,75	0,77	0,80	0,83	0,85	0,88	0,93	0,98	1,02	1,05	1,09	1,12	1,16	1,19	1,21	1,24						
	19°	0,29	0,31	0,32	0,34	0,36	0,37	0,39	0,40	0,42	0,43	0,44	0,45	0,48	0,50	0,52	0,54	0,56	0,57	0,59	0,60	0,61	0,62						
	20°																												
	21°	0,29	0,30	0,32	0,34	0,35	0,37	0,38	0,40	0,41	0,42	0,44	0,46	0,48	0,50	0,53	0,56	0,58	0,59	0,60	0,61	0,62	0,62						
22°	0,58	0,61	0,64	0,67	0,70	0,73	0,76	0,79	0,81	0,84	0,87	0,90	0,96	1,03	1,05	1,09	1,12	1,15	1,18	1,20	1,22	1,23							
23°	0,89	0,94	0,99	1,03	1,08	1,12	1,16	1,20	1,25	1,29	1,33	1,37	1,44	1,51	1,57	1,63	1,67	1,73	1,77	1,80	1,82	1,94							
24°	1,20	1,25	1,31	1,37	1,43	1,49	1,54	1,60	1,66	1,71	1,77	1,82	1,92	2,01	2,10	2,17	2,24	2,30	2,36	2,40	2,42	2,44							
25°	1,51	1,59	1,66	1,74	1,81	1,88	1,95	2,02	2,09	2,16	2,23	2,30	2,42	2,53	2,63	2,72	2,82	2,89	2,95	2,99	3,01	3,05							
26°	1,84	1,92	2,01	2,10	2,18	2,26	2,34	2,42	2,50	2,58	2,65	2,73	2,87	3,00	3,13	3,25	3,36	3,47	3,57	3,65	3,72	3,79							
27°	2,17	2,26	2,36	2,46	2,56	2,66	2,75	2,84	2,93	3,01	3,10	3,18	3,35	3,50	3,66	3,80	3,93	4,06	4,16	4,26	4,35	4,42							
28°	2,50	2,62	2,74	2,85	2,96	3,07	3,18	3,28	3,40	3,50	3,60	3,69	3,87	4,04	4,21	4,36	4,50	4,64	4,75	4,86	4,94	5,00							
29°	2,86	2,98	3,10	3,22	3,35	3,47	3,59	3,70	3,82	3,93	4,03	4,14	4,34	4,53	4,72	4,89	5,05	5,20	5,34	5,46	5,56	5,64							
30°	3,20	3,35	3,49	3,64	3,77	3,91	4,05	4,17	4,30	4,43	4,55	4,67	4,90	5,12	5,39	5,51	5,68	5,94	5,96	6,09	6,16	6,22							

TABLE IV

Temperature corrections  $c$  required for the density of dessert wines measured in a *Pyrex-glass* pycnometer at  $t$  °C, to correct to 20 °C.

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000} \quad \begin{array}{l} - \text{ if } t^\circ \text{ is less than } 20^\circ\text{C} \\ + \text{ if } t^\circ \text{ is more than } 20^\circ\text{C} \end{array}$$

		13% vol. wine										15% vol. wine						17% vol. wine					
		Density								Density								Density					
		1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120	
Temperatures in °C	10°	2,36	2,71	3,06	3,42	3,72	3,96	4,32	2,64	2,99	3,36	3,68	3,99	4,30	4,59	2,94	3,29	3,64	3,98	4,29	4,60	4,89	
	11°	2,17	2,49	2,80	2,99	3,39	3,65	3,90	2,42	2,73	3,05	3,34	3,63	3,89	4,15	2,69	3,00	3,32	3,61	3,90	4,16	4,41	
	12°	1,97	2,25	2,53	2,79	3,05	3,29	3,52	2,19	2,47	2,75	3,01	3,27	3,51	3,73	2,42	2,70	2,98	3,24	3,50	3,74	3,96	
	13°	1,78	2,02	2,25	2,47	2,69	2,89	3,09	1,97	2,21	2,44	2,66	2,87	3,08	3,29	2,18	2,42	2,64	2,87	3,08	3,29	3,49	
	14°	1,57	1,78	1,98	2,16	2,35	2,53	2,70	1,74	1,94	2,14	2,32	2,52	2,69	2,86	1,91	2,11	2,31	2,50	2,69	2,86	3,03	
	15°	1,32	1,49	1,66	1,82	1,97	2,12	2,26	1,46	1,63	1,79	1,95	2,10	2,25	2,39	1,60	1,77	1,93	2,09	2,24	2,39	2,53	
	16°	1,08	1,22	1,36	1,48	1,61	1,73	1,84	1,18	1,32	1,46	1,59	1,71	1,83	1,94	1,30	1,44	1,58	1,71	1,83	1,95	2,06	
	17°	0,83	0,94	1,04	1,13	1,22	1,31	1,40	0,91	1,02	1,12	1,21	1,30	1,39	1,48	1,00	1,10	1,20	1,30	1,39	1,48	1,56	
	18°	0,58	0,64	0,71	0,78	0,84	0,89	0,95	0,63	0,69	0,76	0,83	0,89	0,94	1,00	0,69	0,75	0,82	0,89	0,95	1,00	1,06	
	19°	0,30	0,34	0,37	0,40	0,43	0,46	0,49	0,33	0,37	0,40	0,43	0,46	0,49	0,52	0,36	0,39	0,42	0,46	0,49	0,52	0,54	
	20°																						
	21°	0,30	0,33	0,36	0,40	0,43	0,46	0,49	0,33	0,36	0,39	0,43	0,46	0,49	0,51	0,35	0,39	0,42	0,45	0,48	0,51	0,54	
22°	0,60	0,67	0,73	0,80	0,85	0,91	0,98	0,65	0,72	0,78	0,84	0,90	0,96	1,01	0,71	0,78	0,84	0,90	0,96	1,01	1,07		
23°	0,93	1,02	1,12	1,22	1,30	1,39	1,49	1,01	1,10	1,20	1,29	1,38	1,46	1,55	1,10	1,19	1,29	1,38	1,46	1,55	1,63		
24°	1,27	1,39	1,50	1,61	1,74	1,84	1,95	1,37	1,49	1,59	1,72	1,84	1,95	2,06	1,48	1,60	1,71	1,83	1,95	2,06	2,17		
25°	1,61	1,75	1,90	2,05	2,19	2,33	2,47	1,73	1,87	2,02	2,17	2,31	2,45	2,59	1,87	2,01	2,16	2,31	2,45	2,59	2,73		
26°	1,94	2,12	2,29	2,47	2,63	2,79	2,95	2,09	2,27	2,44	2,62	2,78	2,94	3,10	2,26	2,44	2,61	2,79	2,95	3,11	3,26		
27°	2,30	2,51	2,70	2,90	3,09	3,27	3,44	2,48	2,68	2,87	3,07	3,27	3,45	3,62	2,67	2,88	3,07	3,27	3,46	3,64	3,81		
28°	2,66	2,90	3,13	3,35	3,57	3,86	4,00	2,86	3,10	3,23	3,55	3,77	3,99	4,20	3,08	3,31	3,55	3,76	3,99	4,21	4,41		
29°	3,05	3,31	3,56	3,79	4,04	4,27	4,49	3,28	3,53	3,77	4,02	4,26	4,49	4,71	3,52	3,77	4,01	4,26	4,50	4,73	4,95		
30°	3,44	3,70	3,99	4,28	4,54	4,80	5,06	3,68	3,94	4,23	4,52	4,79	5,05	5,30	3,95	4,22	4,51	4,79	5,07	5,32	5,57		

TABLE IV (continued)

Temperature corrections  $c$  required for the density of dessert wines measured in a *Pyrex-glass* pycnometer at  $t$  °C, to correct to 20 °C.

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000} \quad \begin{array}{l} - \text{ if } t^\circ \text{ is less than } 20^\circ\text{C} \\ + \text{ if } t^\circ \text{ is more than } 20^\circ\text{C} \end{array}$$

		19% vol. wine							21% vol. wine						
		Density							Density						
		1,000	1,020	1,040	1,060	1,000	1,100	1,120	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120
Temperatures in °C	10°	3,27	3,62	3,97	4,30	4,62	4,92	5,21	3,62	3,97	4,32	4,66	4,97	5,27	5,56
	11°	2,99	3,30	3,61	3,90	4,19	4,45	4,70	3,28	3,61	3,92	4,22	4,50	4,76	5,01
	12°	2,68	2,96	3,24	3,50	3,76	4,00	4,21	2,96	3,24	3,52	3,78	4,03	4,27	4,49
	13°	2,68	2,96	3,24	3,50	3,76	4,00	4,21	2,96	3,24	3,52	3,78	4,03	4,27	4,49
	14°	2,11	2,31	2,51	2,69	2,88	3,05	3,22	2,31	2,51	2,71	2,89	3,08	3,25	3,43
	15°	1,76	1,93	2,09	2,25	2,40	2,55	2,69	1,93	2,10	2,26	2,42	2,57	2,72	2,86
	16°	1,43	1,57	1,70	1,83	1,95	2,08	2,18	1,56	1,70	1,84	1,97	2,09	2,21	2,32
	17°	1,09	1,20	1,30	1,39	1,48	1,57	1,65	1,20	1,31	1,41	1,50	1,59	1,68	1,77
	18°	0,76	0,82	0,88	0,95	1,01	1,06	1,12	0,82	0,88	0,95	1,01	1,08	1,13	1,18
	19°	0,39	0,42	0,45	0,49	0,52	0,55	0,57	0,42	0,46	0,49	0,52	0,55	0,58	0,61
	20°														
	21°	0,38	0,42	0,45	0,48	0,51	0,54	0,57	0,41	0,45	0,48	0,51	0,54	0,57	0,60
22°	0,78	0,84	0,90	0,96	1,02	1,07	1,13	0,84	0,90	0,96	1,02	1,08	1,14	1,19	
23°	1,19	1,28	1,38	1,47	1,55	1,64	1,72	1,29	1,39	1,48	1,57	1,65	1,74	1,82	
24°	1,60	1,72	1,83	1,95	2,06	2,18	2,29	1,73	1,85	1,96	2,08	2,19	2,31	2,42	
25°	2,02	2,16	2,31	2,46	2,60	2,74	2,88	2,18	2,32	2,47	2,62	2,76	2,90	3,04	
26°	2,44	2,62	2,79	2,96	3,12	3,28	3,43	2,53	2,81	2,97	3,15	3,31	3,47	3,62	
27°	2,88	3,08	3,27	3,42	3,66	3,84	4,01	3,10	3,30	3,47	3,69	3,88	4,06	4,23	
28°	3,31	3,54	3,78	4,00	4,22	4,44	4,64	3,56	3,79	4,03	4,25	4,47	4,69	4,89	
29°	3,78	4,03	4,27	4,52	4,76	4,99	5,21	4,06	4,31	4,55	4,80	5,04	5,27	5,48	
30°	4,24	4,51	4,80	5,08	5,36	5,61	5,86	4,54	4,82	5,11	5,39	5,66	5,91	6,16	

ANEXO VI

0	1.85	13	1.24
1	1.80	14	1.20
2	1.74	15	1.16
3	1.68	16	1.13
4	1.64	17	1.09
5	1.59	18	1.06
6	1.54	19	1.03
7	1.50	20	1.00
8	1.45	21	0.97
9	1.40	22	0.95
10	1.36	23	0.93
11	1.32	24	0.91
12	1.28	25	0.88

TABLE 1: Relationship of  $P_{aph_{20}}$  excess pressure of semi-sparkling and sparkling wine at 20°C with the  $P_{aph_t}$  excess pressure at temperature  $t$



ANEXO VII



**Ficha de Prova – Análise Sensorial de Vinhos Espumantes**

Provador\_\_\_\_\_ Data\_\_\_\_\_

Classifique os atributos Cor, Aroma e Gosto numa escala de 1 a 6 da seguinte forma:

**Cor:** 1 – Sem Cor 2 – Ligeira 3 – Pouco Intensa 4 – Intensa 5 – Bastante Intensa 6 – Muito Intensa

**Aroma:** 1 – Sem Aroma 2 – Pouco Perceptível 3 – Pouco Intenso 4 – Intenso 5 – Bastante Intenso 6 – Muito Intenso

**Gosto:** 1 – Inexistente 2 – Pouco Perceptível 3 – Pouco Intenso 4 – Intenso 5 – Bastante Intenso 6 – Muito Intenso

		Vinhos espumantes					
		Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
Cor	Aspetto visual						
Aroma	Intensidade						
	Qualidade						
	Equilíbrio						
Gosto	Intensidade						
	Acidez						
	Amargo						
	Persistência						

## Avaliação do efeito da adição de vários produtos enológicos na espuma do vinho espumante

Classifique os atributos: espuma, superfície de espuma, colar de espuma, locais de nucleação, tamanho de bolha e efervescência selecionando com um **X** no adjetivo que melhor o caracteriza:

Adjetivo		Vinhos espumantes					
		Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
Quantidade	Abundante						
	Normal						
	Escassa						
Estabilidade da espuma	Persistente						
	Momentânea						
Efervescência	Rápida						
	Normal						
	Lenta						

Apreciação Global : Escala de hedônica de 0 a 20

	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
Apreciação Global						

Observações (Opcional): Selecione com um **X** o melhor adjetivo para o Colar de espuma,

		Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
Colar de espuma	Parcial						
	Total						
Locais de nucleação	Muitos						
	Poucos						
Tamanho da bolha	Pequeno						
	Médio						
	Grande						

ANEXO VIII

Amostra	Concentração Açúcares g. L <sup>-1</sup> (Glucose + Fucose)
Aff_C	0,58
Aff_OW	0,62
Aff_R	0,59
AffOW_C	0,56
AffOW_OW	0,39
AffOW_R	0,64
AffBd_C	0,65
AffBd_OW	0,40
AffBd_R	0,30